

**WUCHSSTOFFGEHALT UND CHEMISCHE NATUR DES
DIFFUSIONS - UND EXTRAKTIONS-AUXINS
DER KOLEOPTILE VON ZEA MAYS**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Ekkehart Vogel

aus Aue

1967

Druck:
ERNST-REUTER-GESELLSCHAFT
der Förderer und Freunde der Freien Universität Berlin e. V.
DISSERTATIONS-DRUCKSTELLE
1 Berlin 33, Garystr. 45

**WUCHSSTOFFGEHALT UND CHEMISCHE NATUR DES
DIFFUSIONS - UND EXTRAKTIONSAXINS
DER KOLEOPTILE VON ZEA MAYS**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Ekkehart Vogel

aus Aue



Referent: Professor Dr. J. Reinert

Korreferent: Professor Dr. Th. Eckardt

Tag der mündlichen Prüfung: 8.2.1967

Promotion: **12. Apr. 1967**

Inhalt

	Seite
Einleitung	3
Material und Methode	6
Ergebnisse	
I. Analyse des Diffusionswuchsstoffes	
1. Die Auxinabscheidung der Koleoptilspitzen in Abhängigkeit von der Versuchsdauer	17
2. Identifizierung des mobilen Auxins der Elektrophorese	21
3. Papierchromatographie des Ätherlöslichen Wuchsstoffes aus Wasserdiffusaten	27
3/1 Chromatographie im basischen System	30
3/2 Neutrale Chromatographie	42
3/3 Saure Chromatographie	46
4. Vergleichende Bestimmung des Auxingehaltes von Licht- und Dunkelpflanzen	48
5. Untersuchungen zur Methodik	52
II. Untersuchungen an Extrakten aus Koleoptilspitzen	
1. Extraktion mit Äthanol	63
2. Ätherextraktion	66
3. Hemmstoffe	68
III. Native IES in Diffusaten und Extrakten	
1. IES und Artefaktbildungen	70

2. Die enzymatische Bildung von IES aus Tryp- tophan	73
---	----

IV. Fütterungsversuche mit IES

1. Inkubation von Maiskoleoptilsegmenten in IES-Lösungen unterschiedlicher Konzen- trationen	73
--	----

1/1 Vierstündige Fütterungsperiode	83
--	----

1/2 20 Stunden-Inkubation	84
---------------------------------	----

2. Fütterung von IES-2-C ¹⁴ an Koleoptilspitzen und -segmente	91
---	----

Diskussion	101
------------------	-----

Zusammenfassung	125
-----------------------	-----

Literaturverzeichnis	128
----------------------------	-----

EINLEITUNG

Über das natürliche Vorkommen der in den 20er Jahren entdeckten Auxine bestehen nach wie vor unterschiedliche Auffassungen. Allgemein gilt β -Indolylessigsäure (IES) als das physiologisch wichtigste Auxin, doch wird in zahlreichen Arbeiten jüngeren und älteren Datums auch über den Nachweis und die physiologische Bedeutung unbekannter Auxine berichtet, die auf Grund ihrer biochemischen Eigenschaften nicht zum Typ der Indolaurine gezählt werden können (Neuere Zusammenfassungen REINERT 1963, ZENK 1964 und SHANTZ 1966).

In Verbindung mit der Aufklärung phototropischer Reizvorgänge hat das Studium des Auxinstoffwechsels der Gräserkoleoptile einen besonders breiten Raum eingenommen. So wurde bereits vor mehr als 15 Jahren die β -Indolylessigsäure (IES) in der Avenakoleoptile nachgewiesen (REINERT 1950). Auf der Suche nach einem anderen Objekt, die Avenakoleoptile war infolge ihrer geringen Größe und ihres Durchmessers weniger geeignet, bot sich die kompakter gebaute Maiskoleoptile an.

Zunächst aber mißlangen sämtliche Versuche, die IES in diesem Organ nachzuweisen, obwohl bereits 1941 VAN OVERBEEK der Nachweis relativ großer Mengen unbekannter Auxine in Agardiffusaten von Koleoptilspitzen gelungen war.

Über das Scheitern derartiger Experimente berichteten HOUSLEY, BOOTH und PHILLIPS (1956) sowie HAMILTON und BANDURSKI (1958). Im Gegensatz zu diesen Befunden gelang die Identifizierung der IES in unterschiedlichen Reifungsstadien von Maiskörnern bereits vor

mehr als 20 Jahren (BERGER und AVERY 1944, HAGEN-SMIT, DANDLIKER, WITTEW und MURNEEK 1946, STOWE und THIMANN 1954).

Vor etwa fünf Jahren begann sich die Situation hinsichtlich des Vorkommens der IES zu ändern, nachdem TURIAN und HAMILTON 1960 IES in Maistumoren fanden. Tumoren sind für ihren hohen Auxingehalt bekannt.

Erfolge bei der Isolierung geringer Mengen IES aus äthanolischen Extrakten von Maiskoleoptilen, bei der methodische Schwierigkeiten mit Hemmstoffen auftraten, erzielten HAMILTON, BANDURSKI und GRIGSBY (1961). Sie hielten die IES für ein bei der Aufarbeitung hydrolytisch entstehendes Produkt.

In den folgenden Jahren konnte aber in Wasserdiffusaten des gleichen Objektes (SHEN-MILLER und GORDON 1962), wässerigen Alkoholextrakten (REINERT und VOGEL 1965) und wieder in Wasserdiffusaten und Ätherextrakten aus Mais- und Avenakoleoptilen (SHEN-MILLER und GORDON 1966a und b), IES identifiziert werden. Der IES-Nachweis in Extrakten war mit zahlreichen Schwierigkeiten verbunden. Er gelang nur, wenn 70%iger Äthylalkohol verwendet wurde, nicht aber durch Ätherextraktion (REINERT und VOGEL 1965), obwohl IES in Äther außerordentlich leicht löslich ist.

Das warf die Frage nach dem natürlichen Zustand dieses Auxins in der Koleoptilspitze auf, da Hinweise vorlagen, daß die IES während der Aufarbeitung hydrolytisch aus Komplexen (gebundenen Auxinen) entstanden war. In Zusammenhang mit diesen und älteren Untersuchungen (REINERT und FORSTMANN 1959) ist über die

Existenz gelber, gut ätherlöslicher Pigmente berichtet worden, die im biologischen Test Hemmstoffeigenschaften besaßen. Den teilweise in verhältnismäßig hohen Konzentrationen existierenden Substanzen schrieb man in der Hauptsache die Schwierigkeiten zu, die sich der Identifizierung der IES entgegenstellten (REINERT und FORSTMANN 1959, VOGEL 1964, REINERT und VOGEL 1965). Mit den zahlreichen, noch ungelösten Problemen beschäftigt sich die vorliegende Arbeit.

In der ersten Hälfte sind die Auxinverhältnisse der Maiskoleoptile Gegenstand eingehender Untersuchungen. Einen weiteren Schwerpunkt bilden methodische Fragen, da frühere Schwierigkeiten in der Hauptsache methodischer Art waren.

Im zweiten Teil wird einigen neu entstandenen Problemen hinsichtlich des IES-Stoffwechsels im untersuchten Objekt in Fütterungsversuchen mit nicht-markierter und radioaktiver IES an Koleoptilspitzen und -segmenten nachgegangen.

MATERIAL UND METHODE

I. Maisanzucht

Für einen Versuchsansatz wurden 1800 Maiskaryopsen, Hybridmais "PRIOR" der Saatzuchtgenossenschaft Braunschweig, über Nacht in Leitungswasser eingequollen. Die Keimlinge wuchsen in einem Torfsandgemisch unter Dunkelheit bei einer Versuchstemperatur von $25 \pm 0,5^\circ$ und einer relativen Feuchte von 85 bis 90 Prozent. Eine vierstündige Rotlichtbestrahlung, 48 Stunden nach der Aussaat verabreicht, verhinderte ein zu starkes Wachstum des Mesokotyls. Nach 72 Stunden hatten die Koleoptilen die gewünschte Länge erreicht (3-4 cm), so daß sie 0,5 cm von der Spitze entfernt dekapitiert werden konnten. Die Ausbeute ergab 1400 - 1500 Koleoptilspitzen bei einem Ausgangsmaterial von 1800 Karyopsen.

II. Wuchsstoffgewinnung

1. Standardmethode für das Diffusionsauxin

ÄTHERLÖSLICHE FRAKTION. Der Gewinnung des Diffusionsauxins diente folgende Technik: 1400 - 1500 Koleoptilspitzen kamen in eine flache Petrischale ($\varnothing$ 15 cm) mit 40 ml aqua bidest. Dabei schwammen die Spitzen auf der Wasseroberfläche. Die Diffusionsdauer betrug 2 oder 4 Stunden. Der pH-Wert der Lösung wurde anschließend mit 0.5n HCl auf 2.8-.9 eingestellt (nach LARSEN 1955a), die angesäuerte Lösung dreimal mit 30 ml Ätherportionen extrahiert, die Ätherfraktionen vereinigt, der Äther bei Zimmertemperatur unter reduziertem Druck (Vakuumrotationsverdampfer) entfernt und der in 1-2 ml Äther gelöste Rückstand chromatographiert.

WASSERLÖSLICHE FRAKTION. Um ätherlösliche Restauxine quantitativ zu entfernen, schloß sich der Ätherextraktion des angesäuerten Diffusates erneut eine dreimalige

Extraktion des wässerigen Rückstandes mit jeweils 30 ml Äther an (FRAKTION II).

Die wasserlösliche Fraktion wurde dann mit 0.5 n NaOH neutralisiert, bei 50°C zur Trockne eingedampft, der Rückstand mit 2 ml Äther (FRAKTION III) und zum Abschluß mit 2 ml Wasser (FRAKTION IV) extrahiert. Die papierchromatographische Trennung mit abschließendem Avenakoleoptilttest erfolgte für jede Teilfraktion gesondert.

DIE DIFFUSION IN AGAR

Auf eine 0,2 cm dicke, 1,8 cm breite und 2 cm lange Agarplatte, hergestellt aus 1,5 %igem Agar, pH 5.0, werden 100 Koleoptilspitzen 2 oder 4 Stunden lang aufgesetzt. 10 dieser Agarplatten mit insgesamt 1000 Koleoptilspitzen lieferten das Material für einen Versuchsansatz. Der zur Verkürzung der Extraktionsdauer zerkleinerte Agar wird 5 Stunden mit Methanol extrahiert, der Alkohol unter reduziertem Druck entfernt, der Rückstand in Äther gelöst und chromatographiert.

2. EXTRAKTIONS- WUCHSSTOFF

EXTRAKTION MIT 70 %IGEM ÄTHANOL. 1400 bis 1500 Koleoptilspitzen werden mit 50 ml Äthanol übergossen und zwei Stunden lang bei 2-4°C (Kühlschrank) extrahiert. Der äthanolische Bestandteil des Lösungsmittels wird auf dem Wasserbad bei 25-30°C entfernt, der wässrige Rückstand mit 0.5n HCl auf pH 2.8-.9 angesäuert und dreimal mit 30 ml Ätherportionen ausgeschüttelt, die vereinigten Fraktionen eingengt und chromatographiert.

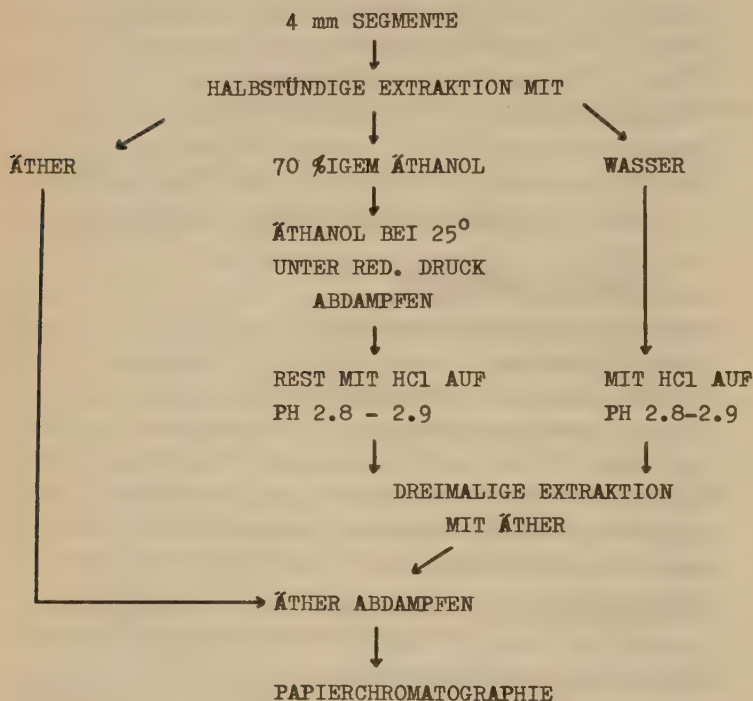
ÄTHEREXTRAKTION. Die Extraktion der Koleoptilspitzen erfolgt, wie bei der äthanolischen Extraktion beschrieben, mit 50 ml Lösungsmittel bei 2 bis 4°C. Der Äther wird direkt eingengt, der Rückstand chromatographisch

oder elektrophoretisch getrennt.

III. INKUBATIONSVERSUCHE

1. INKUBATION VON KOLEOPTILSPITZEN IN IES-LÖSUNGEN

UNTERSCHIEDLICHER KONZENTRATIONEN. 3 mm von der Spitze entfernt werden aus den Koleoptilspitzen 4 mm lange Segmente herauspräpariert. Jeweils 80 Segmente kommen in 20 ml IES-Lösung der nachstehenden Konzentrationen: 10^{-6} , 10^{-5} und 10^{-4} g/ml IES, Kontrolle ohne Auxin. Die Inkubationsdauer betrug 4 oder 20 Stunden. Die weiteren Schritte der Präparation sind aus dem Schema ersichtlich.



2. FÜTTERUNGSVERSUCHE MIT 2-C¹⁴-MARKIERTER IES

Für die Isotopenversuche stand eine an der Methylen-
gruppe markierte IES, spezifische Aktivität 216 Micro-
curie/mg bzw. 37.8 mc/mM, der Firma Amersham (England)
zur Verfügung.

Die Inkubation von 100 0,3 cm langen Koleoptilspitzen
bzw. 25 0,4 cm langen Sproßabschnitten erfolgte in
2 ml Basalmedium (1 Microcurie/2 ml). Die Dauer der
Fütterungsperiode variierte.

Präparationsschema

KOLEOPTILSPITZEN ODER -SEGMENTE



INKUBATION IN STUNDEN: 4,6,8 und 22.



FILTrierEN, MATERIAL MIT WASSER WASCHEN



GEWEBE ZERREIBEN, ZUSATZ von 10 ml WASSER



FILTRAT AUF PH 2.8-2.9 MIT 0.5n HCl



EXTRAKTION MIT ÄTHER, 30 ml PORTIONEN



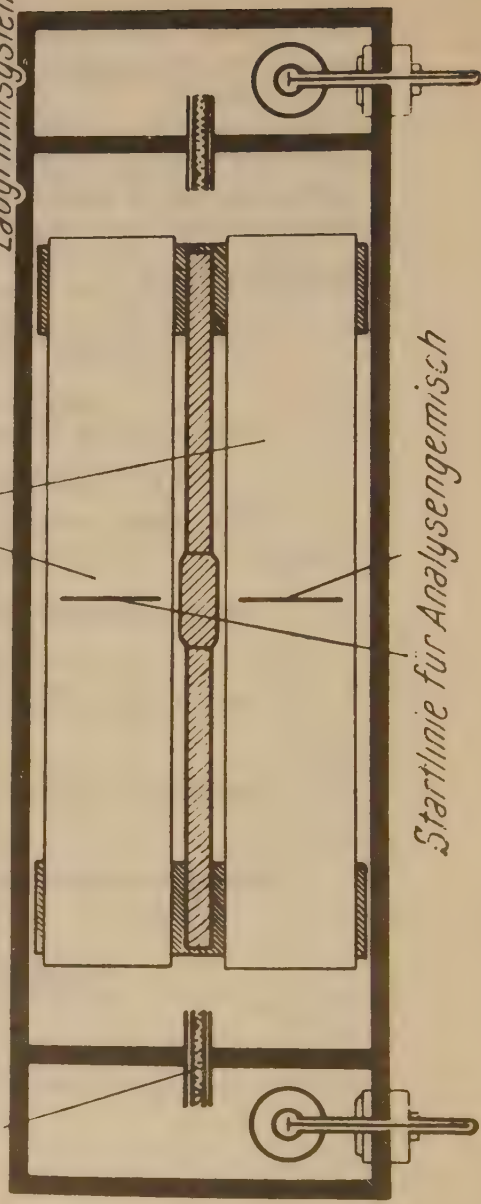
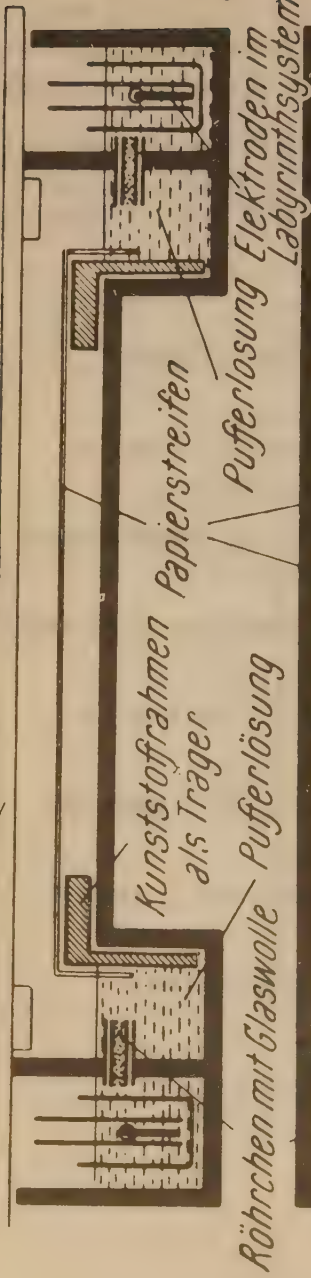
VEREINIGTE ÄTHERFRAKTIONEN z. TROCKNE



PAPIERCHROMATOGRAPHIE

Glasdeckel

1



DOKUMENTATION: Die entwickelten Chromatogramme kamen für 10-14 Tage auf "Radiolix Röntgenfilm Blau" von Agfa. Der Röntgenfilm wurde mit Agepe-Film aufgenommen und davon auf Brovira-Papier (Grad 4) Abzüge angefertigt.

IV. PAPIERCHROMATOGRAPHIE UND ELEKTROPHORESE

Die papierchromatographische Trennung der Pflanzen - extrakte erfolgte nach dem eindimensional absteigenden Verfahren. Diese Technik erwies sich als völlig ausreichend für die Trennung der Extrakte und Diffusate und führte zu brauchbaren Resultaten. Zur Aufsättigung der Papiere mit dem Lösungsmittel kamen die Chromatogramme über Nacht in die Tröge. Die Trenndauer lag für eine Strecke von 16-18 cm zwischen 6 und 8 Stunden.

Lösungsmittel

Basisch: Isopropanol-Ammoniak-Wasser (10:1:1)

(spez. Gewicht des Amm. 0,91)

Neutral: Isopropanol-Wasser (10:1 v/v)

Sauer I: Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:1 v/v)

Sauer II: Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5)

Papier: 2043 b Mgl der Fa. Schleicher & Schüll.

PAPIER-HOCHSPANNUNGS-ELEKTROPHORESE

Die nach VON DENFFER, BEHRENS und FISCHER (1952) in modifizierter Form mit dem technisch einfach gebauten "ELPHOR-GERÄT" durchgeführte Elektrophorese gestattete die gleichzeitige Auftrennung zweier Streifen, Abmessungen 4 x 30 cm (Abb. 1a und b; a Seitenansicht, b Aufsicht). Als Basallösung diente eine im Verhältnis 1:96 verdünnte Pufferlösung (Citratpuffer nach Sörensen, pH 5.8) nach MELCHIOR (1957). Bei ausreichender Verdünnung des Puffers ist eine Kühlung der Apparatur

nicht erforderlich (SCHNEIDER und SPARMANN 1955).

Versuchsbedingungen: Die Trenndauer betrug 20 Minuten bei einer Spannung von 2500 Volt, 1-2 mA/Streifen oder 3-4 mA/Doppelstreifen. Die 2,5 cm breite Startlinie befand sich auf dem 30 cm langen Papierstreifen (Schleicher und Schüll 2043 b Mg1) 21 cm vom anodischen Ende entfernt. Die Aufagstellen für die Streifen erwärmten sich im Verlauf der Trennung nur handwarm. Abschließend kamen die Streifen für 15 Minuten bei 40-50°C in den Trockenschrank.

V. ANALYSE DER WUCHS- UND HEMMSTOFFE

1. Färbungsreaktionen

1/1 Reaktion nach Salkowski mit $\text{FeCl}_3/\text{HClO}_4$ (Uroroseinreaktion) nach der Methode von GORDON und WEBER 1951: Das Reagens besteht aus 1,0 ml 0,5 molarer FeCl_3 -Lösung und 50 ml 35 %iger HClO_4 . Die quantitative Bestimmung der IES erfolgte nach GORDON und PALEG 1957.

1/2 Reaktion nach Ehrlich mit p-Dimethylaminobenzaldehyd. 2g p-Dimethylaminobenzaldehyd werden in 100 ml 1n HCl gelöst. Unmittelbar vor dem Gebrauch wird die Lösung mit Äthanol im Verhältnis 1:1 verdünnt.

1/3 Ninhydrinreaktion

0,1 %ige Lösung von Triketohydrindenhydrat in n-Butanol.

REAGENZIEN FÜR PHENOLE UND -DERIVATE

1/4 Nach BRAY und Mitarbeitern. 25 ml 0,3 %iges p-Nitranilin in 8 %iger HCl werden mit 1,5 ml 5 %iger NaNO_2 -Lösung unmittelbar vor dem Besprühen vermischt. Das Chromatogramm wird mit diesem Reagens und anschließend noch mit einer 20 %igen

Na_2CO_3 -Lösung besprüht.

- 1/5 Eine 0,1n Silbernitratlösung wird mit 5n Ammoniak im Verhältnis 1:1 vermischt. Das Chromatogramm wird 5-10 Minuten auf 105°C erhitzt. Reduzierend wirkende Substanzen erscheinen als braune Flecken (BATE-SMITH und WESTALL 1950).
- 1/6 Pauly-Reagens. 3g Sulfanilamid werden in 200 ml Wasser, 6 ml konz. HCl und 14 ml n-Butanol gelöst. Vor dem Besprühen vermischt man 20 ml dieser Lösung mit 0,3 g NaNO_2 und besprüht das Chromatogramm und dann mit 10 %iger Na_2CO_3 -Lösung. Es erscheinen sofort rote Flecken auf gelbem Hintergrund.
- 1/7 Roux' Reagens. 2g Saccharose werden in 10 ml konz. HCl und 90 ml absolutem Äthanol gelöst. Nach dem Aufsprühen werden die Chromatogramme 1 Minute auf $85-95^\circ\text{C}$ erhitzt. Farbreaktionen im sichtbaren und im UV-Bereich.

2. QUANTITATIV - BIOLOGISCHE ANALYSE

Als physiologische Testmethode diente der von NITSCH und NITSCH (1956) entwickelte Avenatest in modifizierter Form.

- 2/1 Haferanzucht. Siegeshafer aus Svalöf (Schweden) wurde zwei Stunden in Leitungswasser eingequellen. Je 30 Körner kamen in Petrischalen auf Zellstoffwatte mit der Längsfurche so auf der Unterlage liegend, daß der Wurzelpol des Embryos nach unten zeigte. Bei $25 \pm 0,5^\circ$ und $85-90\%$ relativer Feuchte wuchsen die um 45° gekippten Schalen mit den Keimlingen 65 Stunden in völliger Dunkelheit. Nach drei Tagen erfolgte die Präparation des Testmaterials.

Es zeigte sich, daß das verwendete Grünlicht¹

¹Lichtquelle - Osram-L/20W/63, Filter BG 18 und GG 14.

nicht völlig indifferent war, sondern bei den Objekten nach etwa 90 Minuten eine schwache Krümmung auslöste. Die Aufarbeitung der Keimlinge erforderte maximal eine Stunde, so daß der Lichteffect nicht zur Wirkung kam.

2/2 Präparation der Hafersegmente. Aus 2-2,5 cm langen Haferkoleoptilen werden, 3 mm von der Spitze entfernt, 4 mm lange Segmente herauspräpariert, zur Wuchsstoffverarmung für 3 Stunden in einer MnSO_4 -Lösung (10^{-6} g/ml) gehalten. Testpufferlösung: 1,794 g K_2HPO_4 /l, 1,019 g Zitronensäuremonohydrat, 2% Saccharose, pH 5,0.

2/3 Avenakoleoptiltest. Für den eigentlichen Test wird die Laufstrecke der Papierchromatogramme oder Elektrophoresestreifen unter Berücksichtigung der schwach seitlichen Ausbreitung des Analysen - gemisches während der Trennung 3 cm breit genommen (Breite der Startlinie 2 cm) und in 10 RF-Einheiten (0-0,1, 0,1-0,2,...) unterteilt. Im Fall der Elektrophorese werden die Papierstreifen, ausgehend von der Startlinie, in 1 cm lange und 4 cm breite (volle Breite der Streifen) Abschnitte zerlegt. Die zerkleinerten Papierstückchen kommen mit jeweils 15 Avenasegmenten in kleine Glasschalen ($\varnothing$ 3-3,5 cm), die 2 ml Pufferlösung enthalten. Außer der Kontrolle, Pufferlösung + 15 Segmente, liefen IES-Kontrollen (10^{-8} , 10^{-7} und 10^{-6} g/ml IES) mit, die eine quantitative Aussage über den Auxingehalt eines jeden Testabschnittes ermöglichten.

Die IES-Kontrollen sowie der Nullwert erhalten, um identische Versuchsbedingungen zu schaffen, 4-5 cm² große Papierstreifen aus den Randzonen der Chromatogramme.

Die Schälchen mit den Testsegmenten wurden auf einem "Schüttler" 20 Stunden lang in völliger Dunkelheit gehalten. Die Bestimmung der Endlänge der Segmente erfolgte unter dem Mikroskop mit Hilfe eines Okularmikrometers.

2/4 Auswertung und statistische Sicherung der Werte.

Zur Dokumentation wird das Wachstum in Prozent aufgetragen (Ausgangslänge = 0). Der t-Test (PÄTAU 1943) diente der statistischen Sicherung der Meßergebnisse gegen den Nullwert.

Enthielt ein Testabschnitt mehr als 5×10^{-8} IES-Äquivalente (g), so konnte immer auf eine Berechnung des P-Wertes verzichtet werden, da sich dann für P in jedem Fall kleinere Werte als 0.0027 (Ergebnis gut gesichert) ergaben. Sie war nur bei geringeren IES-Äquivalenten von Bedeutung, aber auch hier errechneten sich noch oft Werte unter 0.0027!

ABKÜRZUNGEN

IES Indol-3-Essigsäure,
IAAS Indol-Acetylasparaginsäure,
ICS Indol-3-Carboxylsäure,
TRYP Tryptophan,
IES-2-C¹⁴ methylenmarkierte Indol-3-Essigsäure,
"A2" Auxin 2 und
"A1" Auxin 1.

Lösungsmittel und Methode

I/A/W Isopropanol-Ammoniak-Wasser,
I/W Isopropanol-Wasser,
B/E/W Butanol-Eisessig-Wasser,
PC Papierchromatographie und
HPE Hochspannungs-Papier-Elektrophorese.

Für Vergleichszwecke ist IAAS nach der von GOOD (1956) beschriebenen Methode synthetisch hergestellt worden.

Die verwendeten Chemikalien waren p.a.- oder DAB 6 -Substanzen der Firmen Merck und Fluka, die IES-2-C¹⁴ ein Präparat der Firma "THE RADIOCHEMICAL CENTRE", Amersham, England (Präparat CFA. 202).

ERGEBNISSE

QUALITATIVE UND QUANTITATIVE ANALYSE DER AUXINE IN WASSERDIFFUSATEN AUS MAISKOLEOPTILEN

1. Die zeitabhängige Auxinabgabe

Um zunächst einen Überblick über das von den Koleoptilspitzen pro Zeiteinheit in das Basalmedium abgeschiedene Auxin zu gewinnen, wird das wässrige Medium in bestimmten Abständen gewechselt. Bis zur 10. Versuchsstunde erfolgt das alle zwei Stunden, während die folgende 13-stündige Diffusionsperiode eine Fraktion bildet.

PRÄPARATIONSSCHEMA

1400-1500 KOLEOPTILSPITZEN



DIFFUSION IN 40 ml WASSER (WECHSEL DES
MEDIUMS NACH 2,4,6,8,10 und 23 STUNDEN)¹



EXTRAKTION MIT ÄTHER BEI PH 2.8-.9



ABDAMPFEN ZUR TROCKNE, RÜCKSTAND IN
WENIG ÄTHER LÖSEN



PAPIERELEKTROPHORESE



UNTERSUCHUNG DES IN SEGMENTE
ZERLEGTEN STREIFENS IM BIOTEST

- 1) Diffusat der 0.-2. Versuchsstunde = Fraktion 1,
2.-4. Std = F 2, 4.-6. Std = F 3, 6.-8. Std =
F 4, 8.-10. Std = F 5 und 10.-22. Std = F 6.

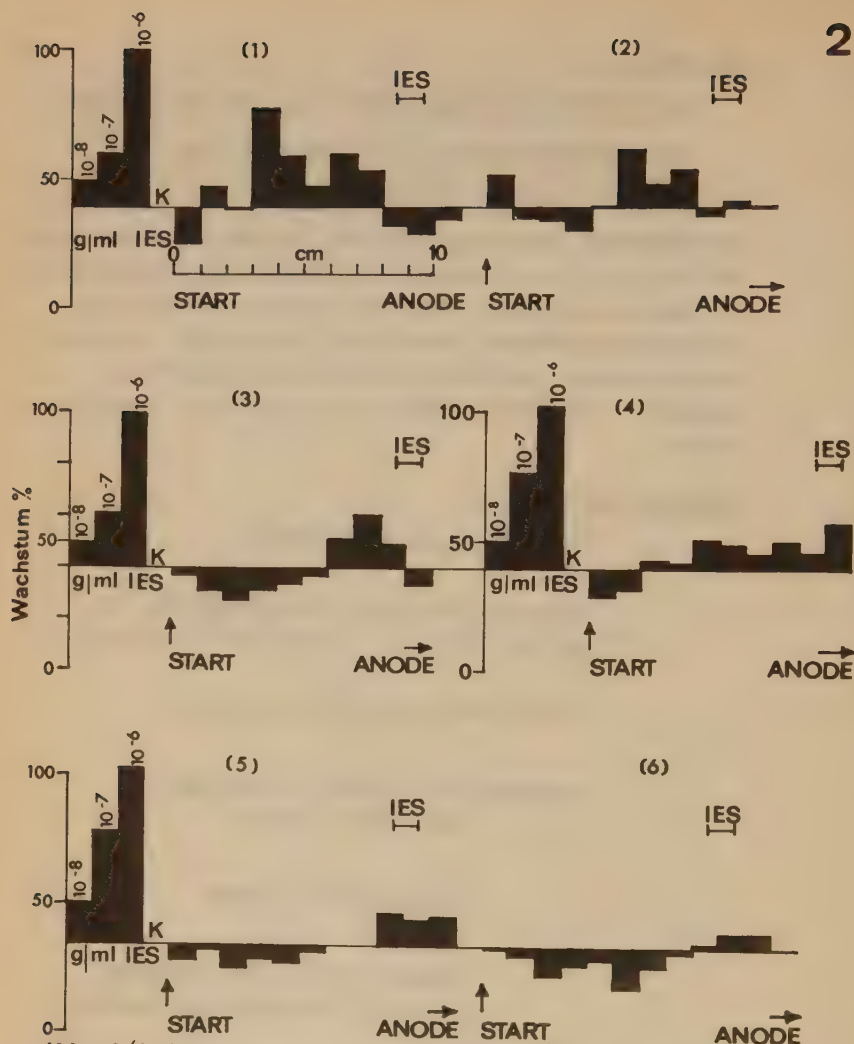


Abb. 2/1-6

Biologische Wirkung papierelektrophoretisch getrennter Ätherfraktionen von Wasserdiffusaten aus 1400 Koleoptilspitzen im Biotest. Kontinuierliche Gewinnung des Wuchsstoffes: 0.-2. Std (1), 2.-4. (2), 4.-6. (3), 6.-8. (4), 8.-10. (5) und 10.-22. (6). Papierstreifen in 1 cm-Segmente zerlegt und getestet.

Abszissen: Entfernung Startlinie-Anode in cm.

Ordinaten: Wachstum (in % der Ausgangslänge), Wirkung synthetischer IES (10^{-8} bis 10^{-6} , K = Kontrolle) im Test.

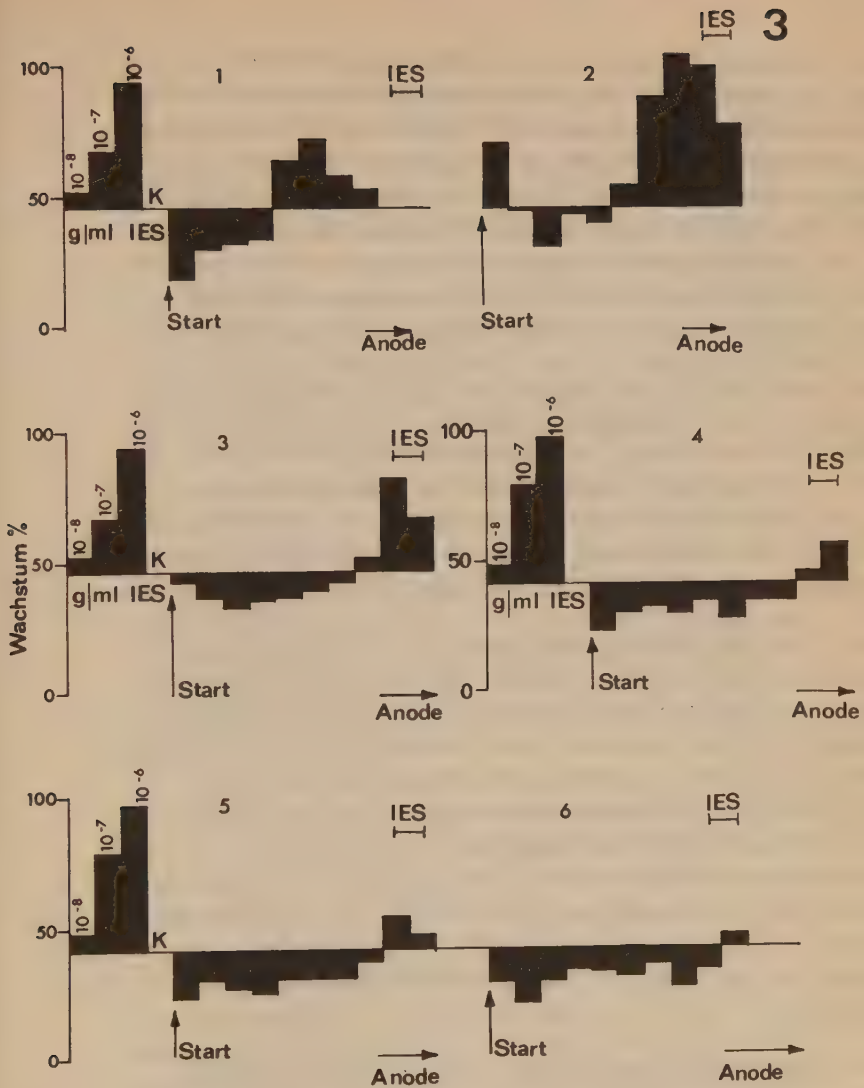


Abb. 3/1-6

Parallelversuch zu Abb.2. Legende siehe dort.

Die Diagramme lassen erkennen, daß der größte Teil des Wuchsstoffes in den ersten vier Stunden nach Versuchsbeginn abgefangen wird und seine Konzentration dann, fortschreitend bis zur 10. Stunde, deutlich absinkt (Abb. 2 und 3). Nach einer Versuchsdauer von zehn Stunden ist das Wuchsstoffpotential der Spitzen praktisch vollständig erschöpft (Abb. 2/6, 3/6), so daß im physiologischen Test sämtliche Werte im Kontrollbereich oder beträchtlich darunter liegen.

Das unter dem Einfluß des nativen Auxins gesteigerte Wachstum der Testsegmente erreicht teilweise ein beachtliches Ausmaß. Die Zuwachsraten der Abschnitte 7-9 in Abbildung 3/2 entsprechen dem relativ hohen Betrag von 10^{-6} IES-Äquivalenten (g/ml). In der Regel sind bei den Fraktionen F 1 und F 2 in den geförderten Segmenten die Werte 10^{-7} bis 10^{-6} g/ml IES äquivalent.

Die einzelnen Diffusatfraktionen unterscheiden sich nicht nur quantitativ, sondern auch qualitativ voneinander. Es sind zwei als Auxin 1 und 2 bezeichnete Auxine im physiologischen Test nachweisbar. Auxin 1 ("A1") wandert im elektrischen Feld zur Anode, wird im Verlauf der Trennung über eine Strecke von mehreren Zentimetern verteilt und besitzt die relativ hohe Konzentration von 10^{-6} g. Es ist eine Säure, deren Anion im schwach sauren pH-Bereich (pH 5.8) zur Anode wandert. Auxin 1 ist, außer in Fraktion 6 (Abb. 2/6 und 3/6), in sämtlichen Fraktionen nachweisbar.

Vom Startpunkt ausgehend beginnt der erste wachstumsfördernde Abschnitt, auf der Anwesenheit des "A1" basierend, für die Fraktion 1 (0.-2. Std) nach drei bzw. vier Zentimetern; davor liegen Zonen mit meist wachstumshemmender Wirkung (Abb. 2/1 und 3/1).

Bei von den Koleoptilspitzen später abgenommenen Diffusatfraktionen verschiebt sich der Einsatzpunkt der durch "A1" ausgelösten Förderung in Richtung Anode (Abb. 2/2 und 3/2). Synthetische IES, die als Kontrolle auf dem Parallelstreifen mitläuft, legt eine Strecke von 8,5 bis 9 cm zurück. Erst das Auxin 1 der dritten Fraktion (F 3) erreicht diesen Wert; zugleich wird hier das Auxin auf einen engeren Bereich zusammenge-drängt (Abb. 2/3 und 3/3). Demnach scheiden die Koleoptilspitzen hauptsächlich in den ersten Versuchsstunden saure Substanzen aus, die das Auxin 1 in seiner Wanderung zur Anode behindern (Abb. 2/1 und 3/1).

Für das zweite Auxin gelten andere Verhältnisse. "A2" läßt sich nur in der Fraktion 2 erfassen (Abb. 2/2 und 3/2). Es fehlt in sämtlichen Experimenten in der ersten Fraktion. Das dürfte auf einer Überlagerung durch saure Hemmstoffe beruhen, wie die Hemmung der Anfangssegmente der Papierstreifen im Biotest deutlich beweist. "A2" wandert während der elektrophoretischen Trennung nicht, besitzt also weder Säure- noch Basencharakter.

Die Fraktionen 1 und 2 gewährleisteten (bei kurzer Versuchsdauer) eine gute Auxinausbeute. Alle folgenden Untersuchungen beschränken sich daher auf diese beiden Fraktionen.

2. Identifizierung nativer IES

Die in Abhängigkeit von der Versuchsdauer variierende Wanderungsgeschwindigkeit des mobilen Wuchsstoffes zeigte sich bereits unter 1. Für diesen Effekt sind schwach saure Hemmstoffe verantwortlich, die, von den Koleoptilspitzen anfangs in beträchtlicher Menge in das Medium abgeschieden, später nicht mehr störend in

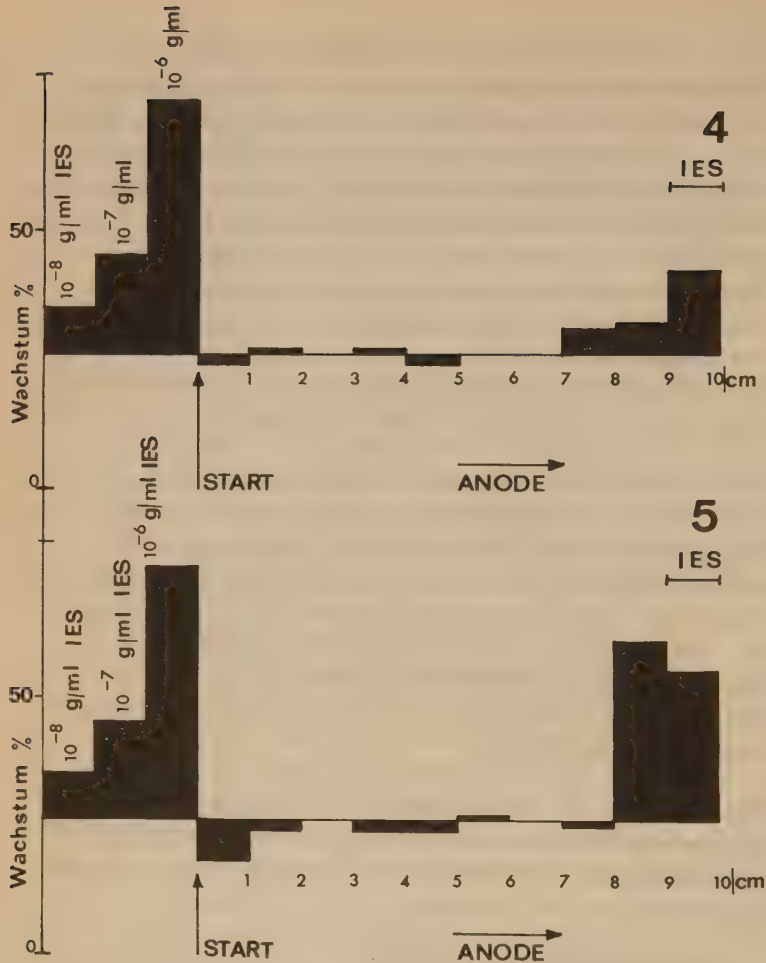


Abb. 4 und 5

Papierelektrophorese und Biotest der Ätherfraktionen eines Wasserdiffusates (0.-2. Std) aus 1500 Spitzen. Ätherfraktion halbiert, eine Hälfte ohne (Abb. 4), die zweite Hälfte mit 5×10^{-7} g synthetischer IES (Abb. 5).

Erscheinung traten. Dieser Verzögerung der Auxinwanderung durch Hemmstoffe liegt ein einfacher Konzentrationseffekt zugrunde, nicht aber eine Hemmstoff-Wachsstoffbindung. Daher wurde versucht, durch Halbierung der Extrakte die Konzentration der Begleitsubstanzen zu verringern, um auf diese Weise den Störeffekt auszuschalten.

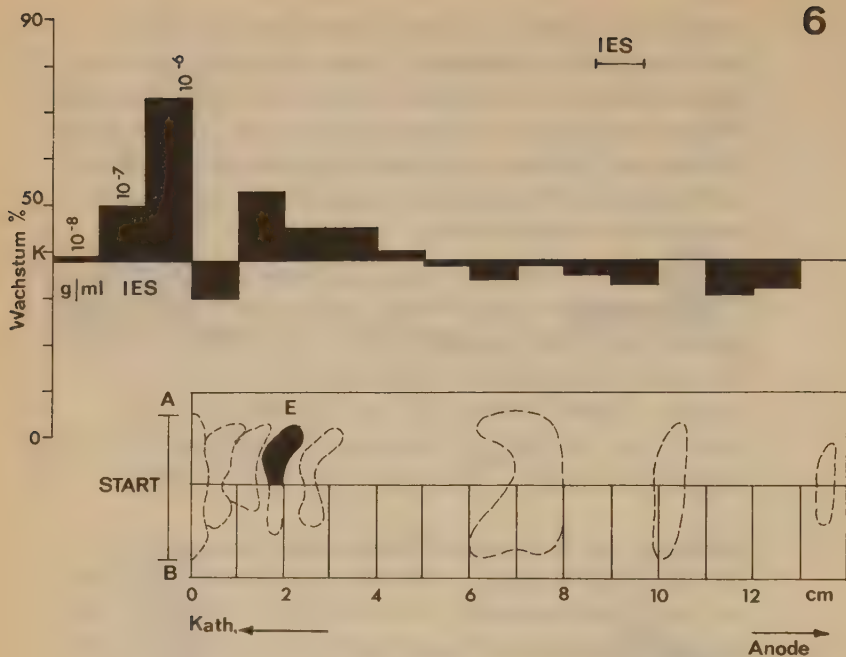
Ein Diffusat der 0.-2. Versuchsstunde aus 1400 Koleoptilspitzen wird halbiert und einer Hälfte $5 \times 10^{-7} \text{ g}$ synthetische IES zugesetzt. Bei der sich anschließenden elektrophoretischen Trennung legt Auxin 1 die gleiche Strecke zurück wie die synthetische IES (Abb. 4 und 5). In der Fraktion mit IES-Zusatz ist die A1-Aktivität um den zugesetzten Betrag verstärkt.

Nachweis des "A1" durch Färbungsreaktionen

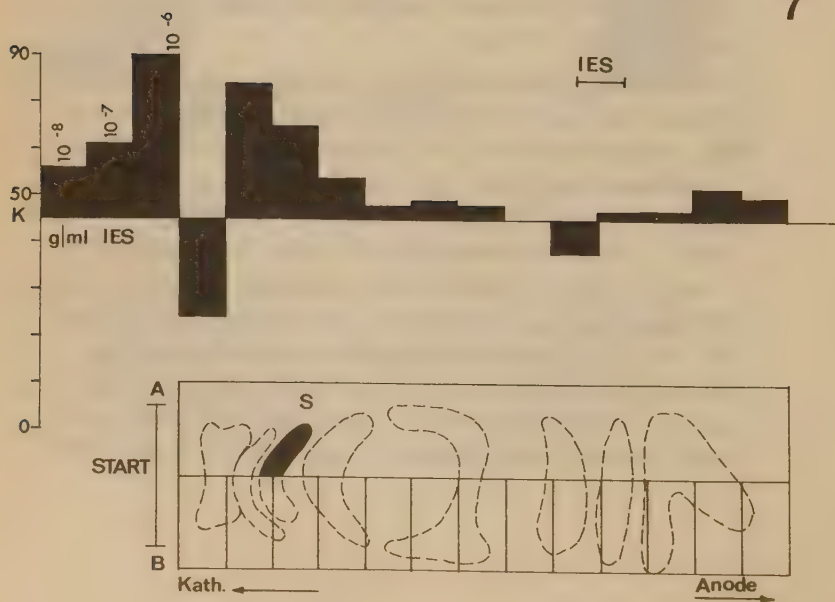
Eine Übereinstimmung in der Wanderungsgeschwindigkeit bei der Elektrophorese, wie sie uns für die IES und das "A1" entgegentritt, genügt allein nicht für eine eindeutige Identifizierung eines unbekannten Auxins. Die folgenden Versuche sollten der endgültigen Klärung dieser Frage dienen.

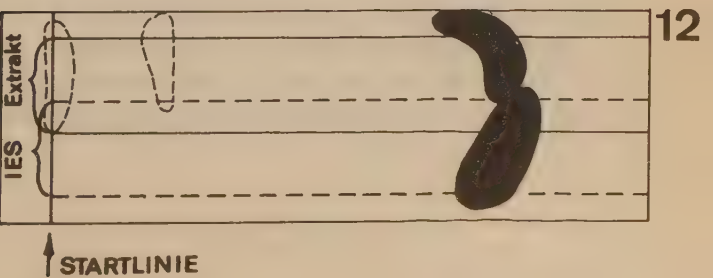
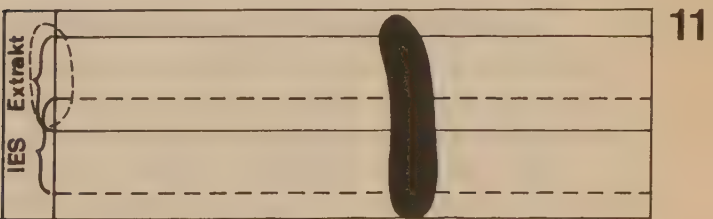
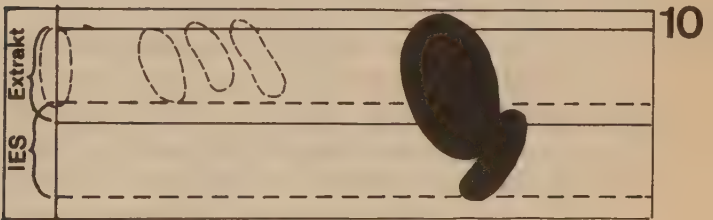
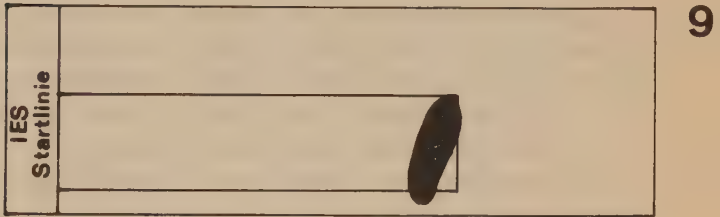
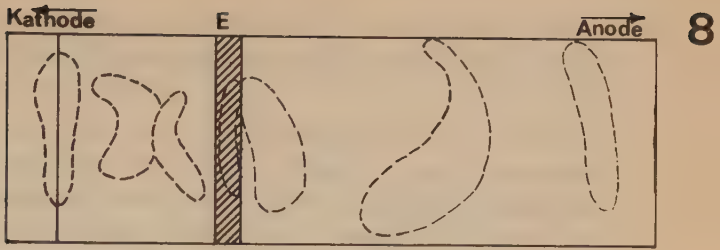
Ein Wasserdiffusat der 0.-4. Std wird papierelektrophoretisch getrennt, der Papierstreifen nach der Trocknung längs halbiert (Abb. 6 und 7), eine Hälfte (Teil 1) im Avenakoleoptiltest auf vorhandene Aktivität geprüft, die zweite Hälfte (Teil 2) mit Ehrlich's Reagens (Abb. 6) oder Salkowskireagens (Abb. 7) entwickelt. 2 bis 3 cm von der Startlinie entfernt treten die für IES typischen Indolfärbungen Rotviolett (E) und Rosa (S) auf. Die korrespondierenden Segmente lösen im Avenatest eindeutige Wachstumsförderungen aus (Abb 6 und 7). Allerdings ist die durch das "A1" zurückgelegte Strecke, verglichen mit der Wanderung der IES -

6



7





Kontrolle auf dem Kontrollstreifen , wieder sehr klein. Die Identität von Auxin 1 mit IES läßt sich trotzdem beweisen.

Ein Diffusat der 0.-4. Std wird elektrophoretisch getrennt, der IES-Bereich anhand seiner blaugrauen Fluoreszenz unter UV-Licht auf dem Papierstreifen abgegrenzt (Abb. 8), mit 2 ml Methanol eluiert und das Eluat abgedampft. Das Eluat und 10^{-6} g synthetischer IES werden für eine zweite elektrophoretische Trennung auf der 2,5 cm breiten Startlinie halbseitig derart präpariert, daß sich beide Komponenten in der Mitte auf einer 0,6 cm langen Strecke überlagern (Abb. 10, 11 und 12). Auf einem weiteren Streifen wird ausschließlich synthetische IES, wiederum nur halbseitig, aufgetragen (Abb. 9). Abschließend werden die getrockneten Streifen mit $\text{FeCl}_3/\text{HClO}_4$ entwickelt.

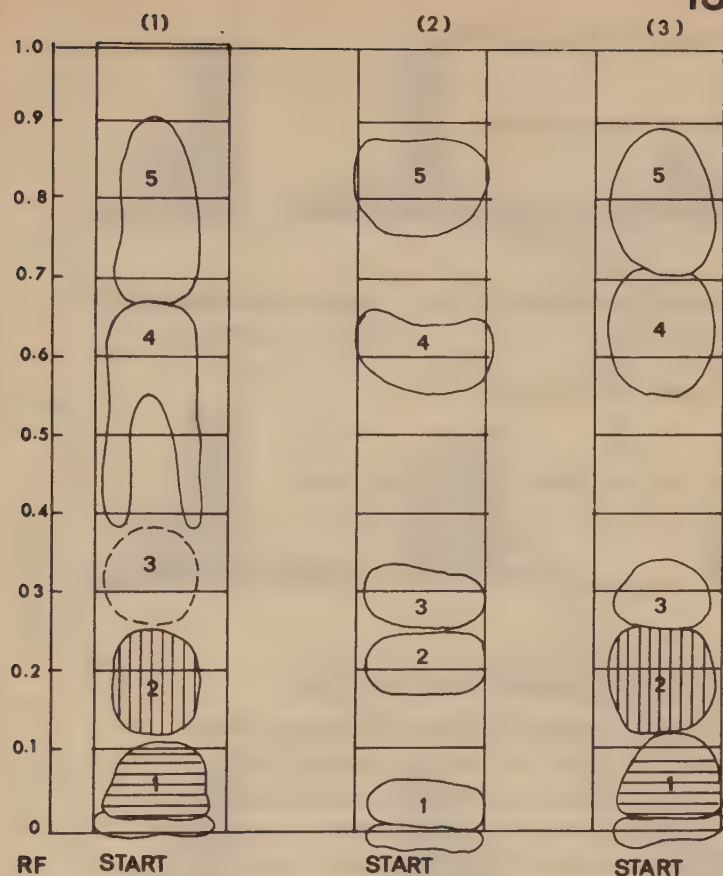
Von Begleitsubstanzen weitgehend isoliert, wandert Auxin 1 jetzt ebensoweit wie synthetische IES und gibt, wie die IES, die typische Reaktion nach Salkowski. Auf Grund der etwas kräftigeren Färbung (Konzentrationsunterschied!) läßt sich die synthetische IES von der nativen abgrenzen (Abb. 10 - 12).

3. PAPIERCHROMATOGRAPHIE VON WASSERDIFFUSATEN

In früheren Untersuchungen mit Ätherextrakten aus Maiskoleoptilen gelang es nicht, mit eindimensionaler Trennung befriedigende Resultate bei der Papierchromatographie zu erzielen (REINERT und VOGEL 1965). Als Laufmittel dienten Isopropanol-Benzin-Wasser (55:30:15), Isopropanol-Wasser (4:1) und Butanol-Äthanol-Wasser (4:1:1). Hauptursache für diese Befunde war die Überlagerung des IES-Bereiches durch saure Hemmstoffe, die einen Nachweis der Auxine verhinderten. Bei zweidimensionaler Papierchromatographie konnte mit dem

Salkowskitest sowie auf physiologischer Basis zwar IES nachgewiesen werden, doch war die Untersuchung zweidimensional getrennter Extrakte im biologischen Test mit einem sehr großen Zeitaufwand verbunden.

Von der Verwendung eines basischen Lösungsmittels, wie es in der Zusammensetzung Isopropanol-Ammoniak-Wasser (10:1:1) für die chromatographische Trennung von Indolderivaten häufig Verwendung findet, wurde Abstand genommen, da in diesem Lösungsmittel sehr leicht Artefaktbildung auftreten kann. Andererseits hat sich gerade dieses Lösungsmittel infolge seiner guten Trenneigenschaften bei Indolaloxinen gut bewährt. Daher ist für die papierchromatographische Analyse der Diffusate ein ammoniakalisches Lösungsmittel der Zusammensetzung Isopropanol-Ammoniak-Wasser (10:1:1) eingesetzt worden. Daneben fand aber auch ein neutrales Laufmittel mit Isopropanol-Wasser (10:1) Verwendung, um eine bei der basischen Papierchromatographie eventuell auftretende Artefaktbildung beurteilen zu können. Im Gegensatz zur Extraktionsmethode, die bedeutend mehr Hemmstoffe aus dem Pflanzenmaterial erfasst, liefert die eindimensional absteigende Technik der Papierchromatographie bei der Trennung von Wasserdiffusaten recht brauchbare Resultate.



Fluoreszenz im
UV-Licht

Natürliche Färbung

1 gelbbraun

grauschwarz

2 grün

orange

3 graublau

Abb. 13

4 dunkelblau

Ätherfraktionen dreier Wasserdiffusate, jeweils 1500 Spitzen, mit I/A/W chromatographiert: 13/1 Diffusat der 0.-2. Std., 13/2 Diff. der 2.-4. Std., 13/3 Diff. der 0.-4. Std. Unter UV-Licht fluoreszierende Substanzen I-V: I und II Hemmstoffe, III native IES, IV und V nicht identifiziert.

5 hellblau

TRENNUNGSGANG DER WASSERDIFFUSATE

1400-1500 KOLEOPTILSPITZEN



2- ODER 4-STÜNDIGE DIFFUSION IN WASSER



EXTRAKTION MIT ÄTHER BEI PH 2.8 → WASSERFRAKTION
VERWERFEN



ÄTHEREXTRAKTE ZUR TROCKNE



RÜCKSTAND IN 2 ml ÄTHER FÜR DIE PC LÖSEN



BASISCHE-



NEUTRALE-



SAURE TRENNUNG

3/1 BASISCHE PAPIERCHROMATOGRAPHIE (I/A/W)

Die im basischen System getrennten Chromatogramme werden zunächst unter UV-Licht betrachtet, die fluoreszierenden Flecken umrandet und die Laufstrecke der Chromatogramme in zehn RF-Einheiten (0.1-0.2 usw.) für den physiologischen Test unterteilt. Die auf diesem Arbeitsschema basierende Auxinanalyse erstreckt sich auf drei verschiedene Fraktionen, die Diffusate der 0.-2., 2.-4. und 0.-4. Versuchsstunde (Abb. 13).

Bei visueller Betrachtung der Chromatogramme fällt sofort ein markanter Unterschied in der Farbkomposition in Nähe der Startzone auf. Während sich die Fraktionen der 0.-2. Stunde und 0.-4. Std im RF-Bereich 0 bis 0.25 durch eine kräftig graugrün bis grauschwarz gefärbte Pigmentzone auszeichnen, fehlt diese im

14

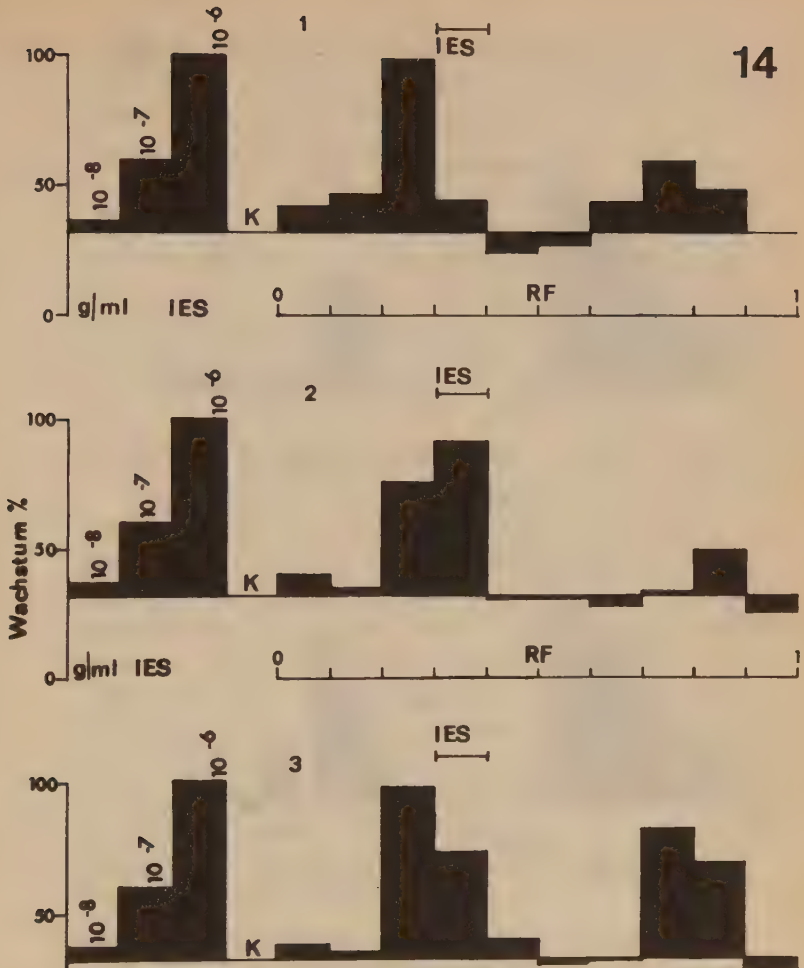


Abb. 14/1-3

Wachstumsdiagramme zu Abb. 13.
 14/1 Diffusat der 0.-2. Std., 14/2 Diffusat der 2.-4. Std.,
 14/3 Diffusat der 0.-4. Std.
 Ordinaten: Zuwachs der Testsegmente in Prozent der Aus-
 gangslänge.
 Abszissen: Aktivität synthetischer IES unterschiedlicher
 Konzentration (links), K=Kontrolle, — RF-
 Position synthetischer IES, Chromatogramm in
 zehn RF-Einheiten unterteilt (rechts).

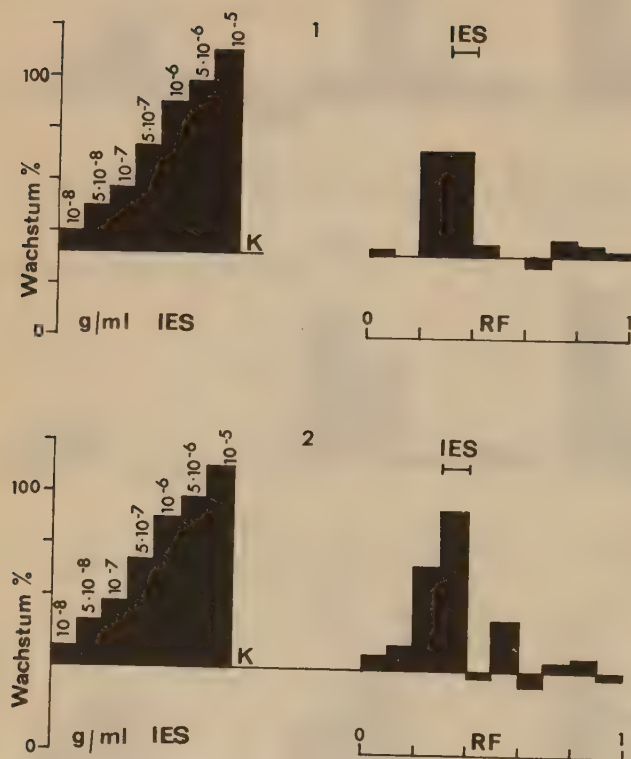


Abb. 15

Papierchromatographie in I/A/W und Biotest von Teilfraktionen (Ätherfraktion eines Diffusates aus 1400 Spitzen halbiert) mit und ohne synthetische IES. 15/1 Teilfraktion ohne, 15/2 mit $5 \times 10^{-7} \text{ g}$ IES.

Diffusat der 2.-4. Std fast vollständig. Diese Umfärbung ist für Verbindungen mit Phenolcharakter in Anwesenheit von Ammoniak typisch.

Offenbar gelangt von den angeschnittenen Zellen nur in den ersten Stunden Hemmstoff in das Medium (möglicherweise als Folge einer Verwundung der Zellen). Im Diffusat der 2.-4. Std aber sind die Phenole in fluoresszenzoptisch kaum noch wahrnehmbarer Konzentration vorhanden (I und II in Abb. 13). III zeigt die schwach blaugraue Fluoreszenz der IES, IV und V sind nicht näher definierbare Substanzen.

Biotest der Papierchromatogramme

In I/A/W (10:1:1) besitzt synthetische IES einen RF von 0,33. Der Rf-Wert für III (Abb. 13/1-3) liegt bei 0,3. Die korrespondierenden Abschnitte aller drei Diffusatfraktionen verfügen über eine beträchtliche Auxinkonzentration, die sich im Avenakoleoptilttest in einer 60-70 %igen Wachstumsförderung gegenüber der Kontrolle niederschlägt (Abb. 14/1-3). Die flächige Verteilung der IES bewirkt, daß zwei Segmente, die Rf-Bereiche 0,2-0,3 und 0,3-0,4, wachstumsfördernd wirken. Diese Aktivität beruht auf der Anwesenheit nativer IES, deren Nachweis keinen Schwierigkeiten unterliegt. Der Zusatz von 5×10^{-7} g IES soll das noch einmal unterstreichen:

Ein Teil einer halbierten Ätherfraktion erhält 5×10^{-7} g IES, die andere Hälfte dient der Kontrolle. Im Rf-Bereich 0,3-0,4 der Teilfraktion mit IES wird das native Auxin genau um den zugesetzten Betrag von 5×10^{-7} g verstärkt, ablesbar durch Vergleich mit den IES-Kontrollen (Abb. 15/1-2). IES-Verluste treten dabei nicht auf.

Teilfraktion ohne IES-Zusatz

RF 0.2-0.3 = 5×10^{-7} IES-Äquivalente (g)

0.3-0.4 = 5×10^{-7} " "

Teilfraktion mit 5×10^{-7} g IES

RF 0.2-0.3 = 5×10^{-7} IES-Äquivalente (g)

0.3-0.4 = 10^{-6} " "

In Übereinstimmung mit den Resultaten der elektro-phoretischen Trennung kann in allen drei Diffusat-fraktionen zwischen zwei Auxinen unterschieden wer-den, die durch eine im biologischen Test meist in-different wirkende Zone getrennt sind. Der RF-Wert für das unbekannte Auxin ("A2") liegt um 0.8. Mit den gebräuchlichen Nachweisreagenzien für Indol-auxine (Salkowski- und Ehrlichreagens) sowie Ninhy-drin gibt "A2" keine Farbreaktion. Eingehendere Untersuchungen sollten nähere Einzelheiten über die physiologischen und biochemischen Eigenschaften dieses Auxins bringen.

Das Verhalten gegenüber Hitzebehandlung. Das unbe-kannte Auxin wurde hinsichtlich seiner Stabilität gegenüber milder Hitzebehandlung geprüft. Die ein-zelnen Arbeitsgänge sind schematisch dargestellt:

EXTRAKTION DES WASSERDIFFUSATES BEI PH 2.8-2.9

MIT ÄTHER

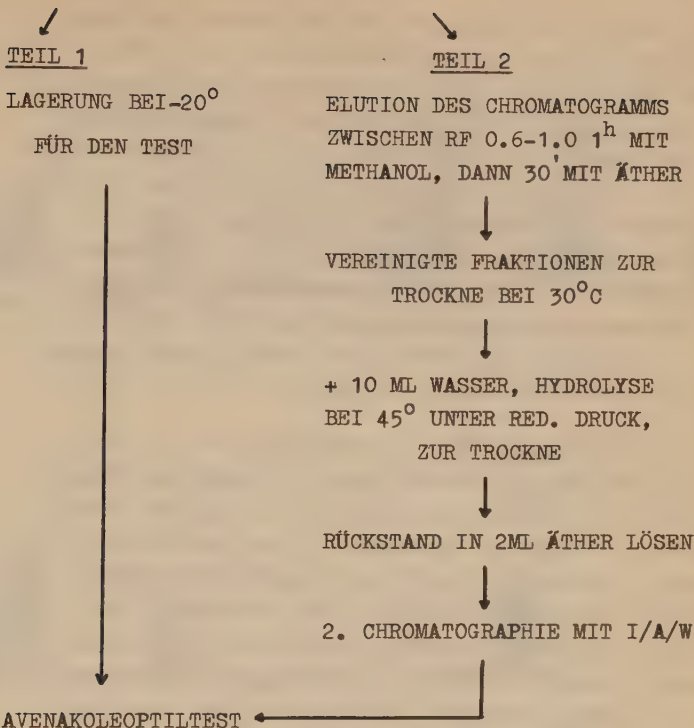


HALBIERUNG DER ÄTHERFRAKTIONEN IN TEIL 1 UND 2



CHROMATOGRAPHIE MIT I/A/W (10:1:1)





Als Resultat dieser Behandlung ergab sich folgendes:

1. Auxin 2 kann bereits durch milde Hydrolyse bei 45° in IES überführt werden (Abb. 16-20). Das unbekannte Auxin stellt eine sehr labile Substanz dar.
2. Der Umwandlungsprozeß erfolgt auch spontan, d.h. unter nicht kontrollierbaren Bedingungen während der Aufarbeitung der Diffusate; er wird aber durch die Hydrolyse beschleunigt. Durch Vergleich mit TEIL 1 ist in jedem Einzelexperiment eine Kontrollmöglichkeit über den Grad der Umwandlung gegeben, d.h. wieviel Auxin jeweils als IES, wieviel als Auxin 2 vorliegt.

In einigen Versuchen tritt die IES bereits am Anfang (nach der 1. Papierchromatographie) in einer relativ hohen Konzentration auf, die Hydrolyse des RF-Bereiches 0.6-1.0 der Teilfraktion 2 mit folgender Rückchromatographie der Hydrolyseprodukte liefert dann nur noch sehr wenig IES (Abb. 17/2,3; 19/2 und 21/2). Bei anderen Experimenten ergibt sich genau das umgekehrte Bild: Bis zum Zeitpunkt der 1. Chromatographie ist nur sehr wenig IES vorhanden, zweimal in kaum nachweisbarer Konzentration (18/1 und 20/1), und die Hydrolyse des "A2" setzt IES in hoher Konzentration frei (Abb. 18/2 und 20/2).

3. Unter den herrschenden Bedingungen von 45° war die Umwandlung "A2" → IES nicht vollständig, denn ein Teil des gebundenen Auxins widerstand der Hitzebehandlung (Abb. 16/2 und 20/2). Eine erkennbare Bildung von IES aus "A2", die sich durch "Schwanzbildung" manifestieren müßte, trat aber nicht auf. Entscheidend dafür, wieviel "A2" nach der 1. Chromatographie aus dem Chromatogramm eluiert werden kann, war der Umwandlungsgrad der Reaktion "A2" → IES zum Zeitpunkt der 1. Chromatographie.

Die physiologische Aktivität des "A2" im Avenatest

Die Chromatogramme nicht hydrolysierter Fraktionen lassen in der "A2"-Position in mehreren Versuchen eine Wachstumsförderung vermissen (Abb. 16/1, 19/1 und 20/1). Aber gerade hier liefert die Hydrolyse der RF-Segmente 0.6-1.0 IES in relativ hoher Konzentration (Abb. 16/2, 20/2). Daher kann das Auxin 2 per se nicht im Biotest aktiv sein, sondern es dürfte das Wachstum der Testsegmente sekundär über eine Freisetzung von IES beeinflussen (Abb. 16/2, 17/2, 19/2 und 20/2).

Die Versuche lassen weiter erkennen, daß die spontan

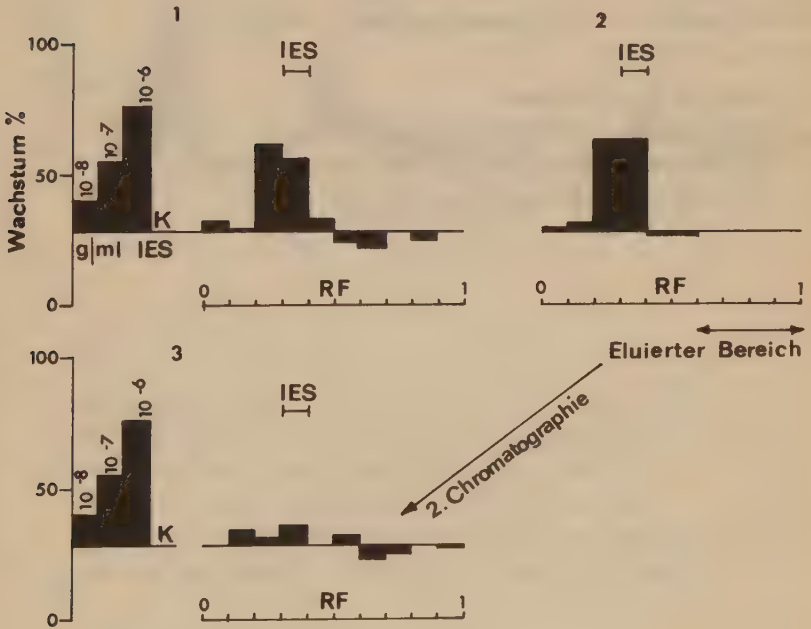
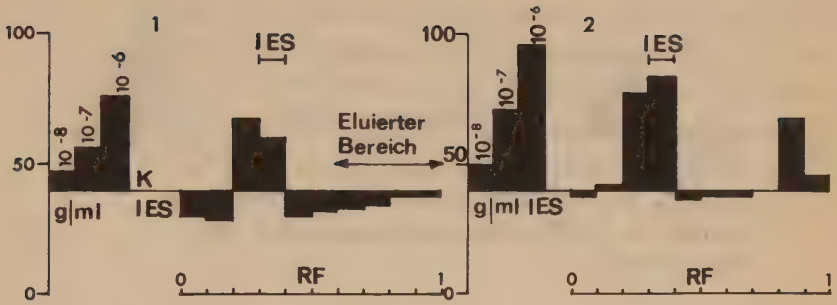


Abbildung 16

Ätherfraktion eines Wasserdiffusates der 0.-4. Std aus 1500 Koleoptilspitzen in Teilfraktion I und II halbiert, 1. Chromatographie in I/A/W (10:1:1).

16/1: Chromatogramm von I im Biotest,

16/2: Chromatogramm von II zwischen RF 0.6 und 1.0 eluiert, bei 45° hydrolysiert, das Hydrolyseprodukt in I/A/W rückchromatographiert und biogetestet.

Abbildung 17

Ätherfraktion aus 1475 Koleoptilspitzen (Parallelversuch zu Abb. 16).

17/1: Fraktion I im Biotest

17/2: Restfraktion II (RF 0-0.6) im Biotest

17/3: Rückchromatographie und Biotest der eluierten Zone (RF 0.6-1.0) von Fraktion II.

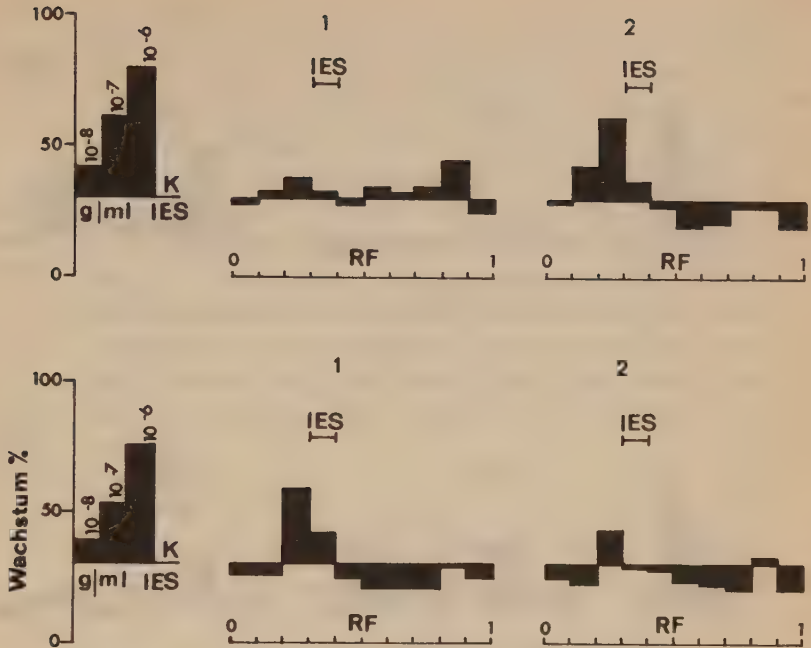


Abb. 18 und 19

Spitzendiffusat aus 1440 (Abb. 18) bzw. 1400 (Abb. 19) Koeptilen (Parallelversuche zu 16 und 17).

18/1 und 19/1: Teilfraktionen I im Biotest.

18/2 und 19/2: Rückchromatographie und Biotest der eluierten Segmente (R_F 0.6-1.0) der Fraktion II.

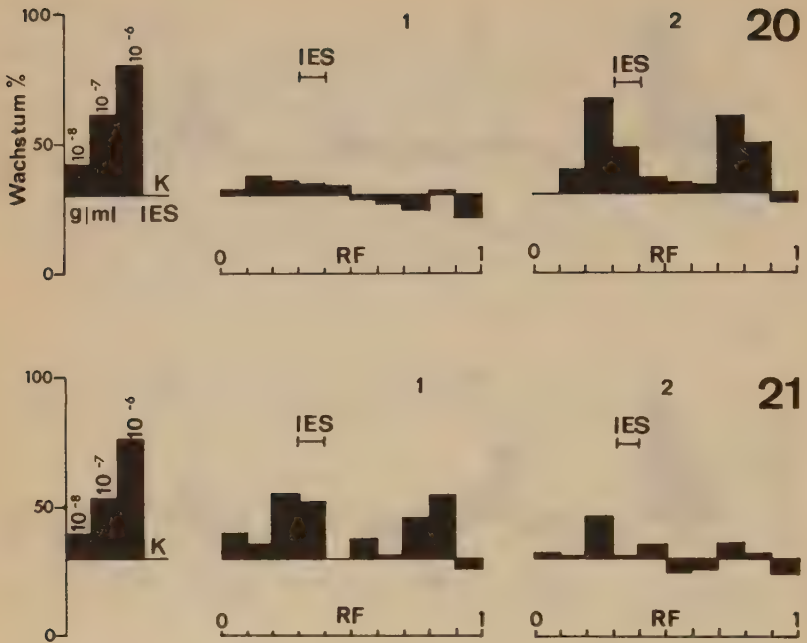


Abb. 20 und 21

Spitzendiffusat (2.-4. Std) aus 1440 (Abb. 20) bzw. 1400 (Abb. 19) Koleontilen (Parallelversuche zu 16 bis 19).

erfolgende Umwandlung im Verlauf des 20-stündigen Tests unterbleiben kann. Hier erweist sich "A2" als relativ stabil. Die Gegenüberstellung mehrerer Versuche in TABELLE 1 unterstreicht die Inaktivität des "A2" im physiologischen Test. Von sechs direkt getesteten Chromatogrammen (Teil I) verfügen nur zwei zwischen RF 0.7-0.9 über Aktivität im Biotest, vier reagieren nicht mit einer Förderung in diesem Bereich. Durch Hydrolyse der "A2"-Position aber wird in den Parallelversuchen in sämtlichen Fällen IES frei, und in vier Versuchen besitzt sogar der "A2"-Bereich noch Aktivität (Restauxin). Die Konzentration der freiwerdenden IES entspricht 10^{-7} IES-Äquivalenten (g).

Tabelle 1

Verteilung der Aktivität vor (Teil I) und nach (Teil II) Hydrolyse des "A2"¹.

	WACHSTUMSFÖRDERNDE AKTIVITÄT			
	TEILFRAKTION I		TEILFRAKTION II	
ABBILDUNG	IES	AUXIN 2	IES	AUXIN 2
Nr 16	+	-	+ !	+ !
" 17	+	-	+ !	+ !
" 18	+	+	+	-
" 19	+	-	+ !	-
" 20	+	-	+ !	+ !
" 21	+	+	+	+

- 1) Signifikante Unterschiede gegenüber der Kontrolle sind mit einem + bezeichnet worden. Als signifikant gelten p-Werte unter 0.0027.

3/2 NEUTRALE PAPIERCHROMATOGRAPHIE

Die Verwendung eines neutralen Lösungsmittels der Zusammensetzung Isopropanol-Wasser (10:1) bietet die Möglichkeit, die im vorhergehenden Abschnitt gewonnenen Resultate auf Artefaktbildung zu überprüfen.

Neben dem I/W-Gemisch fanden auch Wasser und ein Butanol-Äthanol-Wasser-Gemisch (4:1:1) als Lösungsmittel bei der Papierchromatographie Verwendung. Sie bewährten sich jedoch nicht, sondern lieferten infolge einer unzulänglichen und schlechten Trennung des Analysengemisches nicht auswertbare Chromatogramme.

Auch der Einsatz von I/W ist mit einigen Schwierigkeiten verbunden. KURAISHI und MUIR (1964) weisen darauf hin, daß Spuren von Ammoniak die Trennung der IES entscheidend beeinflussen können, indem sie eine Verschiebung des RF zu niedrigeren Werten verursachen. In Übereinstimmung mit den Beobachtungen von KURAISHI und MUIR ergibt sich auf unbehandelten Papieren für die IES ein RF von 0.25-0.35; auf säuregewaschenem Papier aber liegt er zwischen 0.75 und 0.80.

Zur Entfernung von Spuren alkalischer Salze war eine kurzfristige Behandlung der Papiere mit 1 %iger Essigsäure sowie ein Erhitzen auf 60-70° (2 Std) erforderlich. Während der neutralen Chromatographie unterblieb jegliches Arbeiten mit Ammoniak im Raum. Bei genauer Einhaltung dieser Vorsichtsmaßregel waren die RF-Werte für die IES gut reproduzierbar.

NACHWEIS VON IES UND AUXIN 2

Die Aufarbeitung der Wasserdiffusate erfolgte wieder nach der in der Methode beschriebenen Standardtechnik.

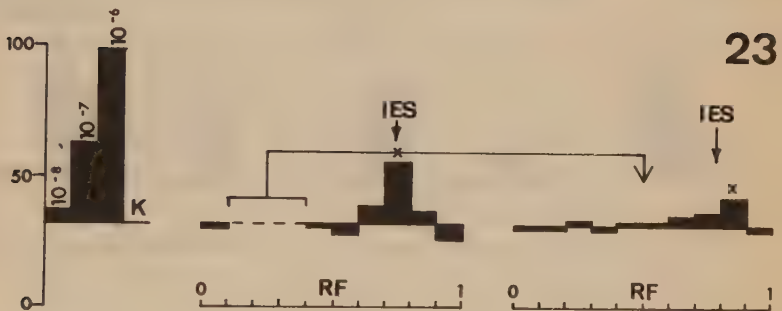
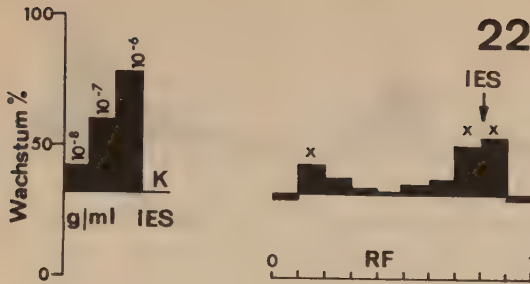


Abb. 22

Wachstumsdiagramm eines Diffusates (Ätherfraktion) aus 1500 Koleoptilspitzen (2-stündige Diffusion). Chromatographie in I/W (10:1), IES = Rf-Wert synthetischer IES, x = signifikante Förderung (P unter 0,0027).

Abb. 23

Ätherfraktion aus 1350 Spitzen (2-stündige Diffusion) neutral chromatographiert, zwischen 0,1-0,4 ("A2") eluiert, das Eluat nach Hydrolyse bei 45°C neutral rechromatographiert (23 rechts). Das linke Diagramm zeigt die Aktivitätsverteilung des Restchromatogramms.

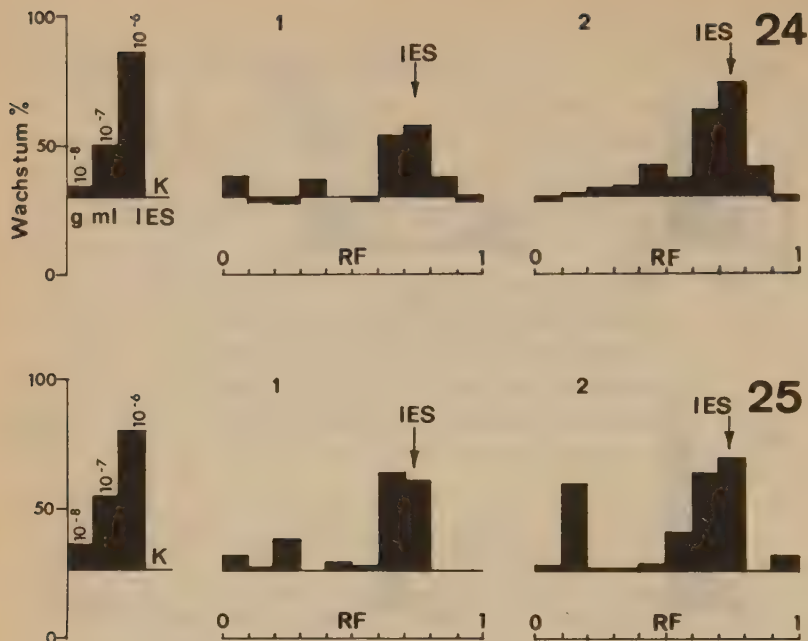


Abb. 24 und 25

Wasserdiffusat (Ätherfraktion) von 1500 Spitzen halbiert, eine Teilfraktion ohne (24/1), die zweite mit 5×10^{-7} g IES-Zusatz (24/2). Wachstumsdiagramme neutral getrennter Chromatogramme.

25: Parallelversuch (1400 Spitzen). 25/1 ohne, 25/2 mit 5×10^{-7} g synthetischer IES.

Wie auf basisch getrennten Papieren ist im Avena-koleoptiltest eine Unterscheidung zwischen IES (RF 0.7-0.8) und Auxin 2 (RF um 0.2) möglich (Abb. 22). Die hydrolytische Spaltung des "A2" durch Behandlung bei 45° liefert wiederum IES (Abb. 23). Wie bei der ammoniakalischen Chromatographie reagieren die zwischen der "A2"- und der IES-Position gelegenen RF-Abschnitte mehr oder weniger wachstumsfördernd (Abb. 22-25), was auf eine geringe Freisetzung von IES aus "A2" schließen läßt, aber auch Schwankungen des Kontrollwertes zugeschrieben werden kann.

Allgemein ist die Auxinaktivität neutral getrennter Ätherfraktionen im Koleoptiltest geringer als nach der basischen Trennung; hier etwa 10^{-6} IES-Äquivalenten entsprechend lag sie dort nur zwischen 10^{-7} und 5×10^{-7} IES-Äquivalenten.

Ursache dieser Differenz ist eine schwache Überlagerung durch Hemmstoffe bei der neutralen Chromatographie, die infolge ihres lipophilen Charakters zwar nur in geringer Konzentration auftreten, aber doch eine geringe Schwächung der IES-Position verursachen können, während sie in I/A/W die IES nicht überdecken.

Zusatz von 5×10^{-7} g IES

Eine Hälfte einer geteilten Ätherfraktion erhielt 5×10^{-7} g synthetische IES (Abb. 24 und 25). Im 1. Versuch wird bei IES-Zusatz ausschließlich die Aktivität in der IES-Position verstärkt (Abb. 24/2). Ein interessantes Resultat liefert ein 2. Versuch (Abb. 25). Hier kommt es infolge der Zugabe von 5×10^{-7} g IES nicht zu der erwarteten Steigerung der Aktivität im IES-Bereich (im Vergleich zur Teilfraktion ohne IES-Zusatz); dafür ist die Aktivität der "A2"-Position (0.1-0.3) gegenüber der Kontrollfraktion stark gefördert (Abb. 25/1 und 2, Tabelle 2).

Tabelle 2

POSITION	TEILFRAKTION	RF	WACHSTUM (%)
AUXIN 2	ohne IES	0.1-0.2 0.2-0.3	27 38
	mit IES	0.1-0.2 0.2-0.3	59 ! 27
IES	ohne IES	0.6-0.7 0.7-0.8	64 61
	mit IES	0.6-0.7 0.7-0.8	64 69
<u>IES-KONTROLLEN</u>		WACHSTUM (%)	
10^{-8} g/ml		36	
10^{-7} "		55	
10^{-6} "		80	

Die Umformung von "A2" in IES hat sich in zahlreichen Versuchen gezeigt. Das Experiment mit IES-Zusatz deutet auf eine Reaktion in Gegenrichtung hin, der "A2"-Bildung aus zugeführter IES. Bei der Besprechung der "Fütterungsversuche" wird auf dieses Problem noch einzugehen sein.

3/3 SAURE PAPIERCHROMATOGRAPHIE

Von den Indolauxinen gilt die IES als besonders empfindlich gegenüber Säurebehandlung. Sie wird, je nach der Stärke der Behandlung, teilweise oder völlig zerstört (LARSEN 1955). Als Ergänzung zur basischen und neutralen Chromatographie sind die ätherlöslichen Bestandteile der Wasserdiffusate mit Butanol-Eisessig

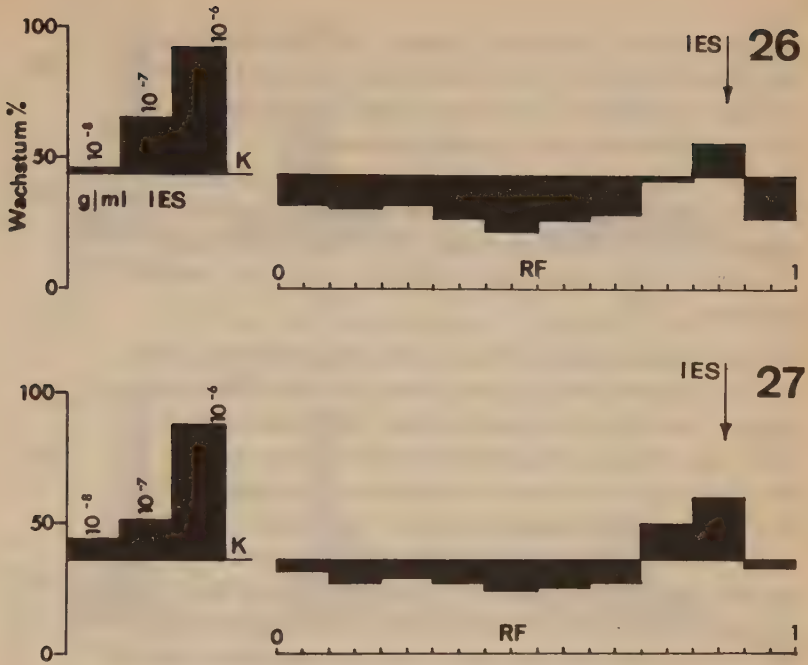


Abb. 26 und 27

Biotest von mit Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:1) chromatographierten Diffusaten (Ätherfraktion) aus 1500 bzw. 1350 (27) Koleoptilspitzen.

-Wasser (4:1:1) getrennt worden. Die Schälchen mit den IES-Kontrollen sowie die reine Kontrolle (Pufferlösung) erhielten im Koleoptilttest Papierabschnitte aus den Randzonen der Chromatogramme.

Die im Vergleich mit den Resultaten der basischen und neutralen PC stark reduzierten Zuwachsraten dieser Kontrollen wiesen auf eine negative Beeinflussung durch Spuren des Lösungsmittels im Avenatest hin.

Die Chromatogramme mußten daher zur Entfernung des Lösungsmittels zwei Stunden lang bei 60-70°⁰ behandelt werden, was bei der sauren Natur des Laufmittels einer Zerstörung der IES Vorschub leisten mußte, da es praktisch einer sauren Hydrolyse gleichkam. Die Resultate in Abbildung 26 und 27 beweisen, daß sich trotz dieser Behandlung nicht alle Lösungsmittel - spuren beseitigen lassen. Der überwiegende Teil des Chromatogramms (RF 0-0.7) wirkt wachstumshemmend, und nur in der IES-Position wird das Wachstum gefördert, aber auch hier kommt es zu Aktivitätsverlusten gegenüber früheren Experimenten.

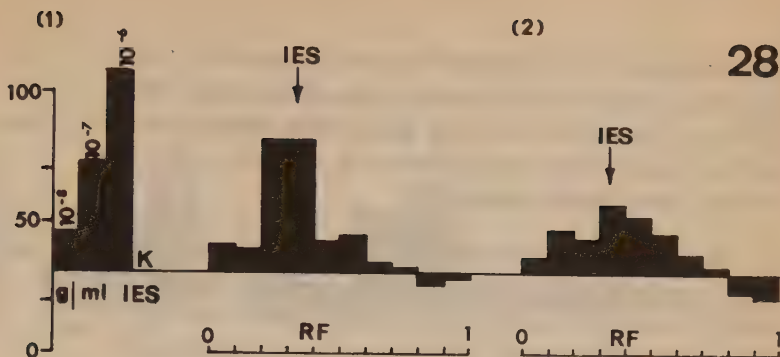
Die saure Chromatographie lieferte unbrauchbare Resultate und konnte für eine Trennung der Auxine nicht ernstlich in Frage kommen.

4. DER AUXINGEHALT VON LICHT- UND DUNKELPFLANZEN

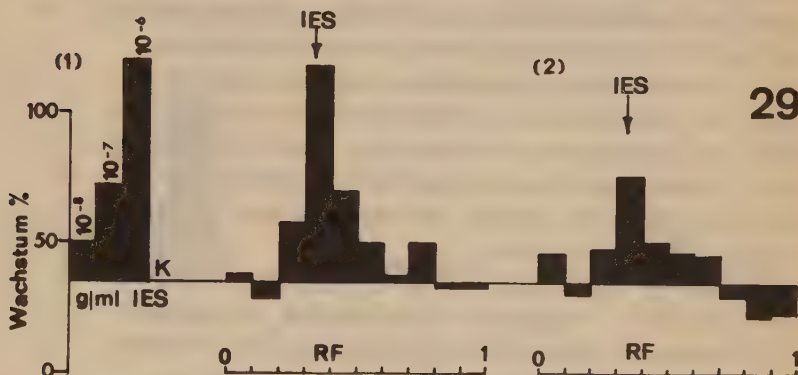
Unter Licht gewachsene Avenakoleoptilen und Mais - koleoptilen besitzen nach BURKHOLDER und JOHNSTON einen niedrigeren Auxingehalt (Diffusionsauxin) als Dunkelpflanzen. Es ist daher vorteilhafter, bei der Analyse von Auxinen unbekannter Objekte von Dunkelpflanzen auszugehen.

Unter "Normalbedingungen" ist die Pflanze dem tages-

28



29



30

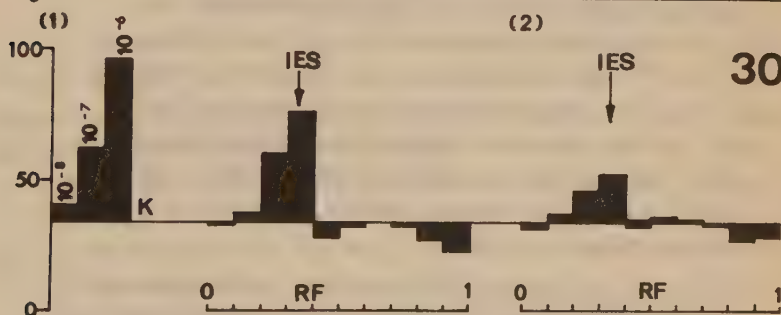


Abb. 28-30

Vergleichende Bestimmung des Auxingehaltes von Licht- und Dunkelpflanzen. Wachstumsdiagramme der Chromatogramme von Diffusaten (4-stündige Diffusion) in Dunkelheit (Abb. 28/1, 29/1, 30/1) oder unter weißem Fluoreszenzlicht (Abb. 28/2, 29/2, 30/2) gewachsener Koleoptilen, Chromatographie in I/A/W (10:1:1). Ausgangsmaterial jeweils 2 x 735 (Abb. 28), 2 x 715 (Abb. 29) und 2 x 680 (Abb. 30/1-2) Koleoptilspitzen.

periodischen Licht - Dunkelwechsel ausgesetzt, etioliierte Pflanzen stellen somit einen Sonderfall dar. Die an etioliierten Objekten gewonnenen Erkenntnisse dürfen daher nicht ohne Vorbehalte auf die grüne Pflanze übertragen werden.

In mehreren Versuchsserien ist der Auxingehalt von Licht- und Dunkelpflanzen vergleichend bestimmt worden, indem von jeweils 700 unter Licht bzw. in Dunkelheit gewachsener Pflänzchen das Diffusatauxin nach der Standardmethode zwei Stunden lang abgefangen wurde. Die Lichtpflanzen waren einem 12-stündigen Hell - Dunkelwechsel unterworfen und wuchsen unter 2000 Lux (weiße Leuchtstofflampen Osram 21 R). Die Wahl der Lichtperiode erfolgte so, daß die Pflänzchen nach Ablauf einer 12-stündigen Lichtperiode die gewünschte Länge von 2-3 cm, das war der Fall nach 72 Stunden, erreicht hatten.

Das Ergebnis sind, ablesbar durch Vergleich mit den IES-Kontrollen, eindeutige Unterschiede im Auxingehalt zwischen Hell- und Dunkelpflanzen (Abb. 28-30). In Dunkelobjekten (10^{-6} - 10^{-7} IES-Äquivalente) ist sehr viel mehr Auxin vorhanden als in Lichtpflanzen (10^{-7} - 10^{-8} IES-Äquivalente); das Verhältnis beträgt etwa 10:1. Bei diesen Versuchen entstand der Eindruck, als ob teilweise während der Papierchromatographie IES aus "A2" freigesetzt würde (28/2, 29/1-2). In einem Versuch ist dieser Effekt besonders deutlich ausgeprägt (28/2).

Eindeutige, qualitative Unterschiede in der Auxinzusammensetzung zwischen grünen und etioliierten Pflanzen traten aber nicht auf.

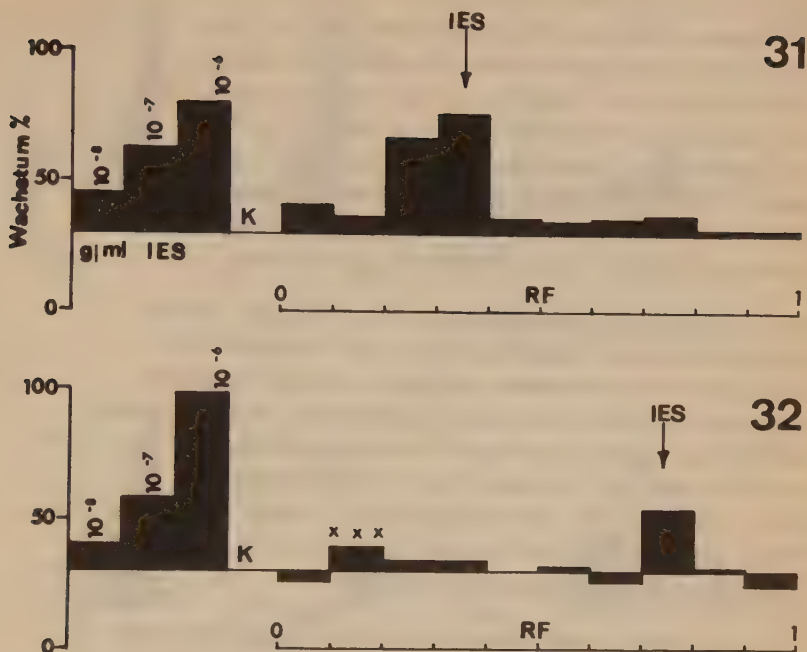


Abb. 31 und 32

Chromatogramme von Rohfraktionen (Wasserdiffusate ohne Vorreinigung) im Avenakoleoptilttest.

31: Ein Wasserdiffusat der 0.-4. Std aus 750 Spitzen basisch,

32: Diffusat der 0.-2. Std aus 1400 Spitzen neutral chromatographiert.

xxx = signifikante Wachstumsförderung (P unter 0.0027).

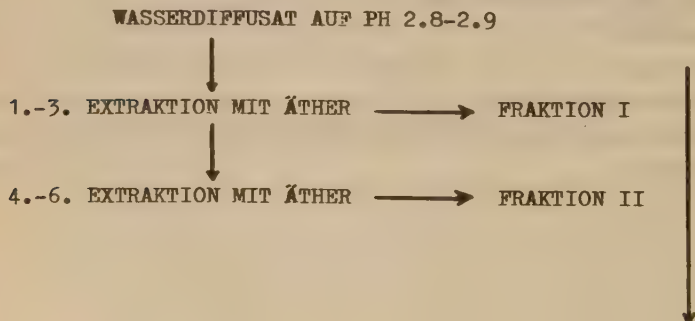
5. UNTERSUCHUNGEN ZUR METHODIK

Ein Schwerpunkt der Untersuchungen lag bei den ätherlöslichen Wuchsstoffen der Koleoptilspitze. Dieser Abschnitt befaßt sich mit der Auxinaktivität der neutralen Ätherfraktion, die bei pH 8.0 vom Wasserdiffusat abgetrennt werden kann, mit der nach saurer Ätherextraktion zurückbleibenden Wasserfraktion, mit dem Ausgangsdiffusat (Rohdiffusat) selbst sowie der Methode der Diffusion als solcher.

Die Rohfraktion (Rohdiffusat). Kein anderer Versuch als die direkte Chromatographie des unbehandelten Rohdiffusates war besser geeignet, die weitgehende Abwesenheit störender Begleitsubstanzen in Diffusaten zu dokumentieren. Das betrifft gleichermaßen die neutrale und die basische Papierchromatographie (Abb. 31-32). IES ist im Rohdiffusat immer vertreten, "A2", wie auch in den früheren Experimenten, dagegen nicht in jedem Versuch nachweisbar.

Der Auxingehalt der ätherunlöslichen-wasserlöslichen Rückstände. Die Vollständigkeit der Ätherextraktion.

Die Brauchbarkeit der Standardmethode, der dreimaligen Extraktion mit Äther, läßt sich auf folgende Weise überprüfen:



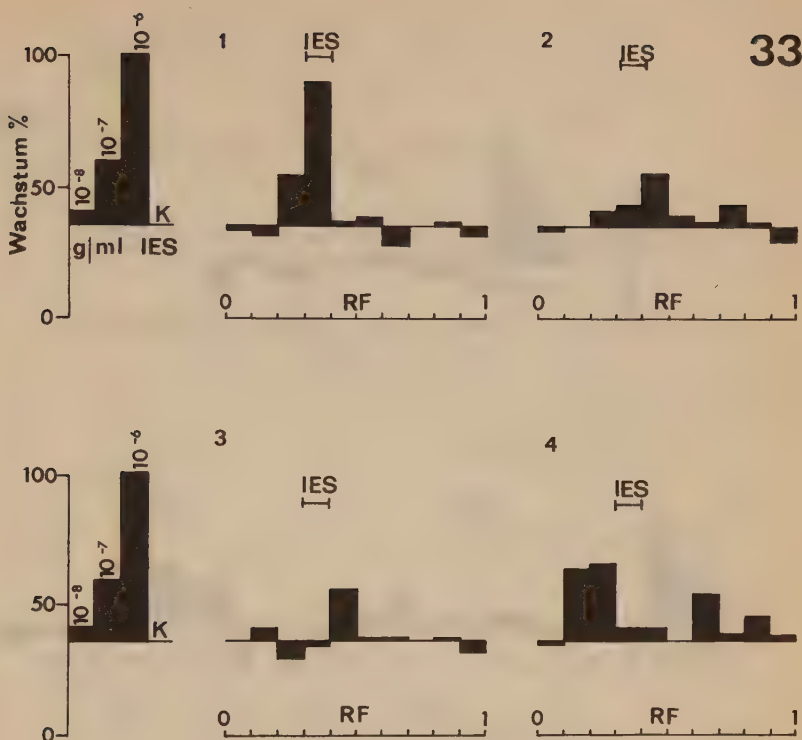


Abb. 33/1-4

Fraktionierte Ausschüttelung eines Wasserdiffusates aus 1450 Spitzen (2-stündige Diffusion) mit Äther. Wachstumsdiagramme der in I/A/W getrennten Teilfraktionen

33/1: 1.-3. Ätherextraktion (FRAKTION I)

33/2: 4.-6. " (FRAKTION II)

33/3: Erneute Extraktion des nach Neutralisation bei 60-70°C hydrolysierten Rückstandes mit Äther (FRAKTION III)

33/4: Wasserlösliche Rückstände (FRAKTION IV).

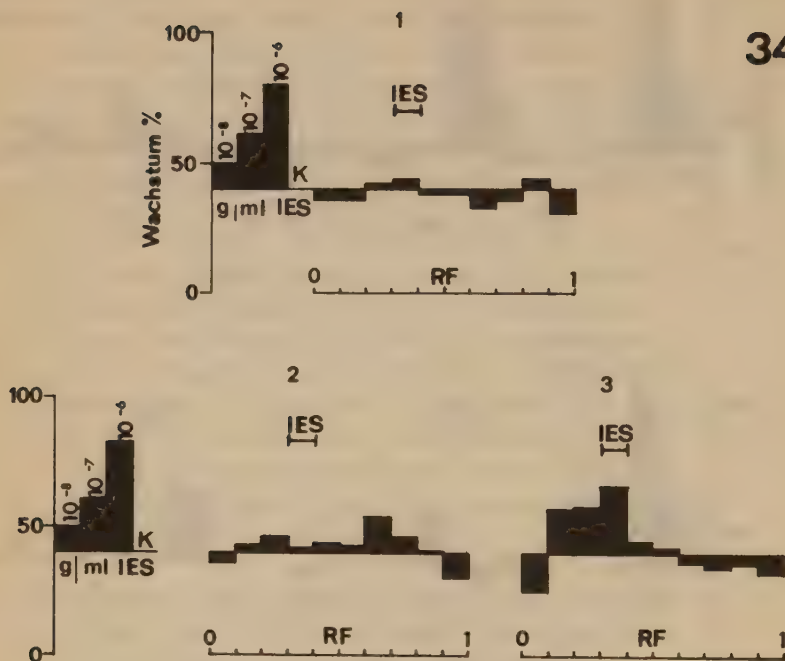


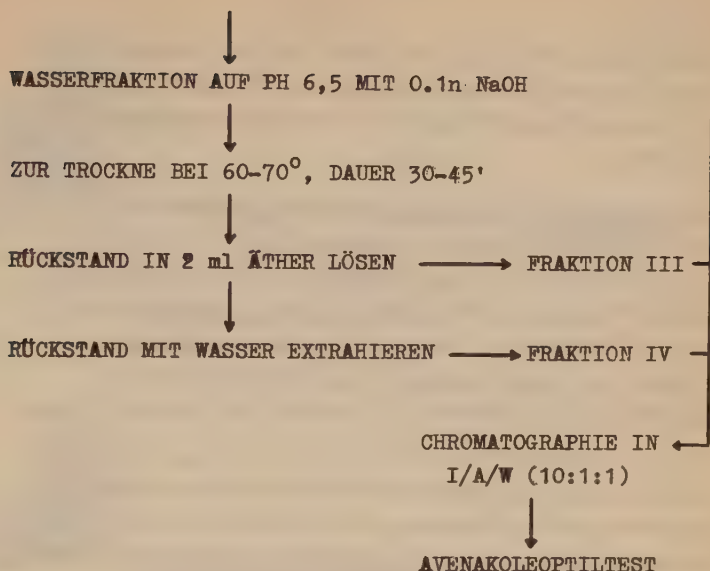
Abb. 34/1-3

Parallelversuch zu Abb. 33

34/1: 4.-6. Ätherextraktion (FRAKTION II)

34/2: Extraktion mit Äther nach Hydrolyse der neutralisierten Wasserfraktion bei $60-70^{\circ}\text{C}$ (FRAKTION III)

34/3: Wasserlösliche Rückstände (FRAKTION IV).



Durch die erste Extraktion wird das ätherlösliche Auxin weitgehend als IES aus der angesäuerten Wasserfraktion entfernt (Abb. 33/1).

Bei erneuter Extraktion werden mit Fraktion II nur noch geringe Mengen ätherlöslichen Wuchsstoffes erfaßt (Abb. 33/2 und 34/1), die entweder Reste des nicht vollständig entfernten Auxins darstellen oder aber aus wasserlöslichem Auxin während der wenigen Minuten der Aufarbeitung neu entstanden sind. Dieser Auxinanteil beträgt, gemessen an der Konzentration der Fraktion I, maximal 10 Prozent jener Menge.

Im Anschluß an die Hitzebehandlung des wässrigen Rückstandes bei 60-70° kann in Fraktion III erneut ätherlösliches Auxin erfaßt werden. Die fördernden Bereiche liegen oberhalb der IES-Position (33/3) oder

direkt in der Position des "A2" (34/2)). Lage und Verteilung der fördernden Segmente in 34/2 lassen auf IES-Produktion während der Papierchromatographie schließen.

Die Wasserfraktion selbst (Fraktion IV) verfügt noch über eine beträchtliche Auxinaktivität (Abb. 33/4 und 34/3). Obgleich die RF-Werte der fördernden Segmente mit dem der IES übereinstimmen, kann es sich hier keinesfalls um freie IES handeln (inwieweit während der Chromatographie aus wasserlöslichem Wuchsstoff IES entsteht, ist dabei eine andere Frage)).

Infolge der Zugabe von HCl und NaOH (vergl. Schema Seite 55) muß die Wasserfraktion über einen relativ hohen Salzgehalt verfügen. Salze können aber bei der Chromatographie störend in Erscheinung treten, indem sie die RF-Werte beeinflussen.

Der Aussagewert des RF ist für die FRAKTION IV daher gering einzustufen. Wichtig erscheint in erster Linie die Tatsache, daß nach weitgehend quantitativer Entfernung der ätherlöslichen Auxine im wässrigen Rückstand 10^{-7} - 10^{-6} IES-Grammäquivalente erhalten bleiben (Abb. 33/4 und 34/3) und daß durch Hitzebehandlung wasserlösliches in ätherlösliches Auxin überführt werden kann.

Die neutrale Ätherfraktion

Allgemein werden unter der Bezeichnung "NEUTRALE ÄTHERFRAKTION" die bei pH 8.0 mit Äther aus einer wässrigen Basallösung extrahierbaren Bestandteile verstanden. Von den Indolauxinen gehören Indolacetaldehyd (IAAld) und Indolacetonitril (IAN) in diese Gruppe, während die IES als Säure im alkalischen pH-Bereich in ihrer wasserlöslichen Salzform vorliegt.

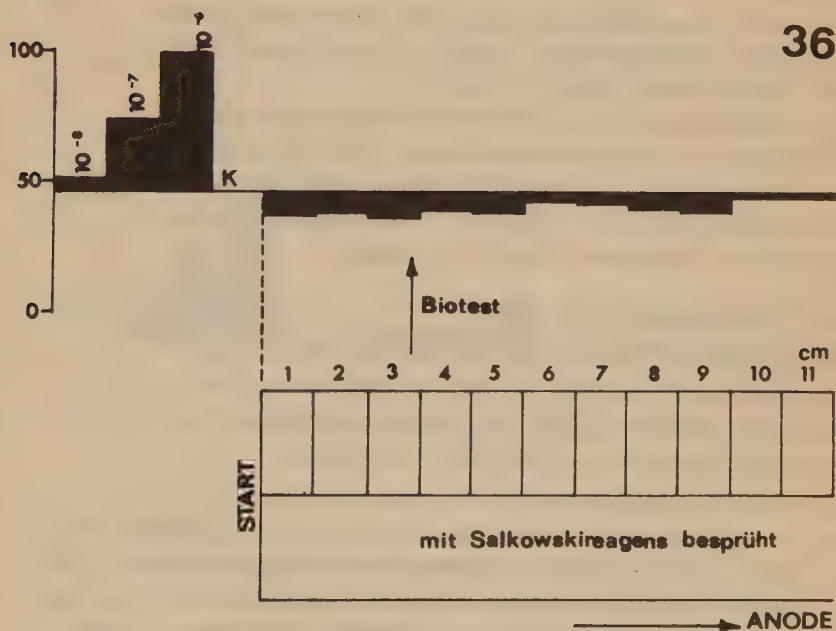
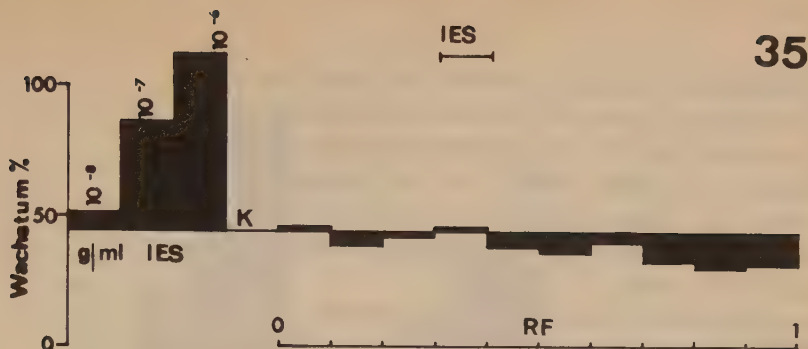


Abb. 35 Wachstumsdiagramm einer neutralen Ätherfraktion, Chromatographie in I/A/W (10:1:1).

Abb. 36 Elektrophorese einer neutralen Ätherfraktion. Papierstreifen längs halbiert, 1 Streifen mit $\text{FeCl}_3/\text{HClO}_4$ entwickelt, Parallelstreifen im Biotest (oben i. Bild) untersucht.

Die Standardmethode läßt bei der Gewinnung der ätherlöslichen Bestandteile eine Unterteilung in eine neutrale und eine saure ätherlösliche Fraktion vermissen. Der Grund hierfür ist das Fehlen neutraler Wuchs- und Hemmstoffe in der Koleoptile. Eine Trennung in neutrale und saure Ätherfraktion ist deshalb überflüssig.

Die in Abbildung 35 und 36 wiedergegebenen Resultate papierelektrophoretisch bzw. papierchromatographisch getrennter neutraler Ätherfraktionen dokumentieren das Fehlen neutraler Auxine in der wässrigen Lösung. Sämtliche Wachstumswerte liegen bei oder knapp unter dem Kontrollwert (Abb. 35 und 36).

Die Salkowskireaktion liefert ebenfalls keinen Anhaltspunkt für ein neutrales Auxin (Abb. 36). Bei der Aufarbeitung der Wasserdiffusate nach der Standardmethode kann daher auf eine Trennung der ätherlöslichen Fraktionen verzichtet werden.

Die Agar-Abfangmethode

Die klassische Agar-Diffusionstechnik findet allgemein bei der Gewinnung des Diffusionswuchsstoffes weit mehr Anwendung als die technisch einfacher zugängliche Methode der Diffusion in Wasser.

Bei einem Ausgangsmaterial von 1400-1500 Koleoptilen pro Versuch war die Abfangmethode mit einem zu großen Zeitaufwand verbunden, so daß die Wasserdiffusion den Vorrang vor der Agartechnik erhielt. Grundsätzlich lieferten beide Methoden in qualitativer Hinsicht weitgehend identische Resultate, obgleich die Wasserdiffusion aus methodischen Gründen kritisiert worden ist (KURAIISHI und MUIR 1964).

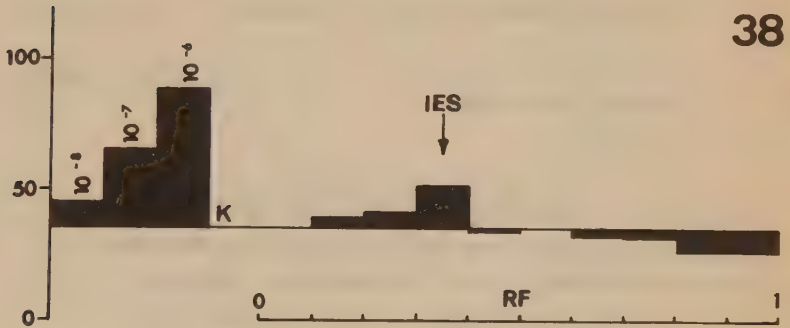
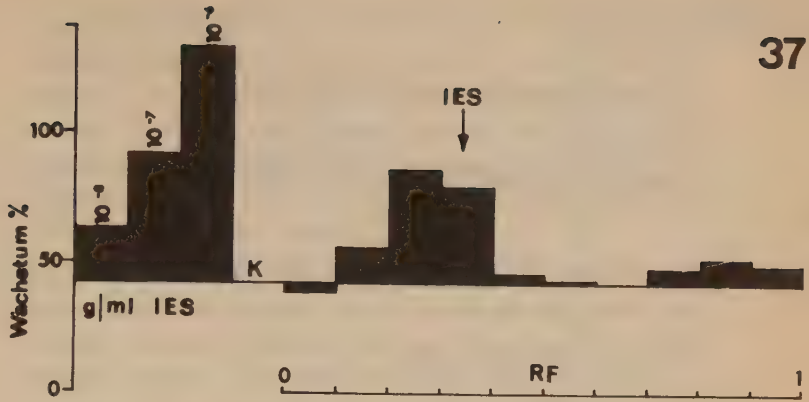
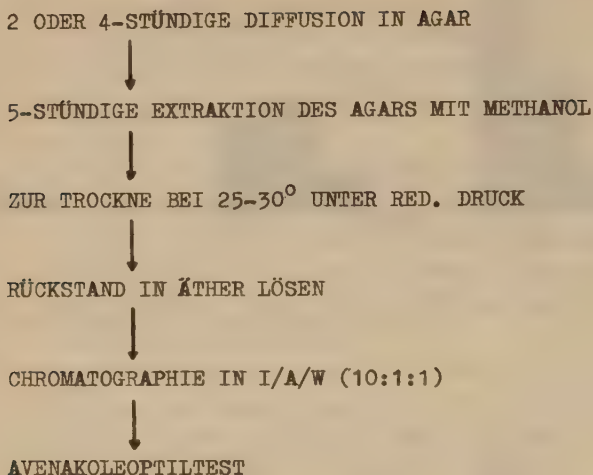


Abb. 37 und 38

Wachstumsdiagramme der ätherlöslichen Wuchsstoffe aus Agardiffusaten. Chromatographie in I/A/W (10:1:1). 4-stündige (37) bzw. 2-stündige Diffusion (38) von 1000 Koleoptilspitzen in Agar.

Präparationsschema:



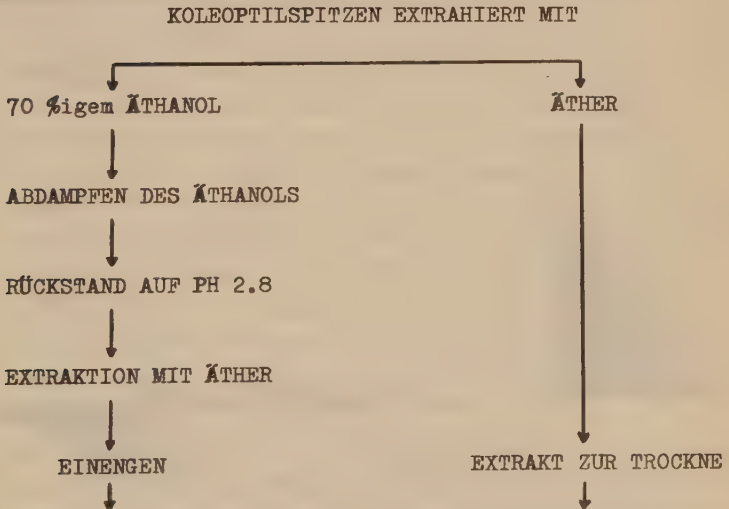
Nach basischer Trennung der ätherlöslichen Bestandteile können einmal nur IES (Abb. 38), im zweiten Experiment IES und Auxin 2 nachgewiesen werden (Abb. 37). Mit der Agartechnik wird weniger Auxin erfaßt als mit Wasserdiffusaten; weiter ist nach zweistündiger Versuchsdauer im Agar bedeutend weniger Auxin vorhanden als nach vierstündiger Diffusion, eine Erscheinung, die in dieser Form bei Wasserdiffusaten nicht festgestellt werden konnte.

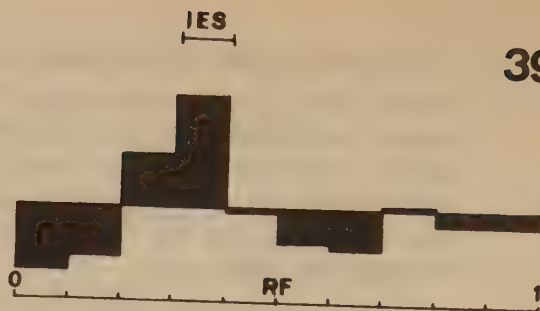
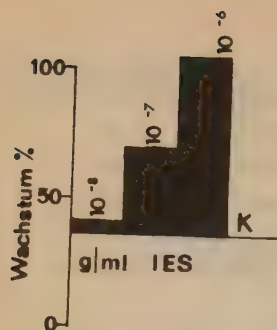
II. DER AUXINGEHALT VON EXTRAKTEN AUS MAISKOLEOPTILSPITZEN

Bisher gelang die Identifizierung nativer IES in Extrakten aus Koleoptilspitzen nur, wenn als Lösungsmittel 70 %iger Äthylalkohol diente und die chromatographische Trennung zweidimensional erfolgte. Bei Ätherextraktion war das Ergebnis in jedem Fall negativ (REINERT UND VOGEL 1965).

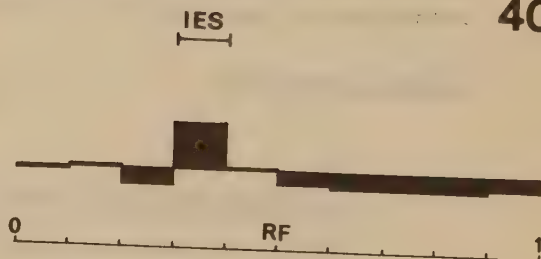
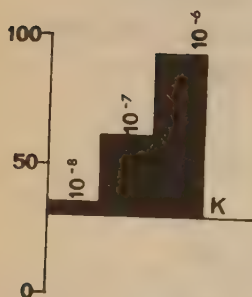
Der auf chemischer und physiologischer Basis ohne erhebliche Schwierigkeiten gelingende Nachweis der IES in Wasserdiffusaten gab den Ausschlag für eine erneute Bearbeitung äthanolischer und ätherischer Extrakte. Vor allem den Ätherextrakten wurde besondere Aufmerksamkeit gewidmet.

Extraktionstechnik:

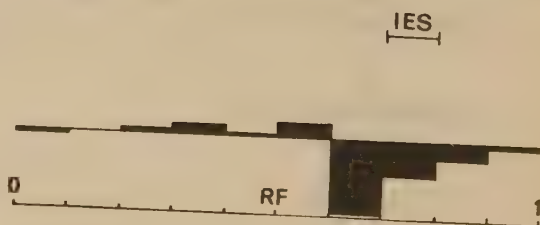
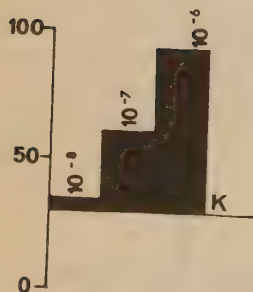




39



40

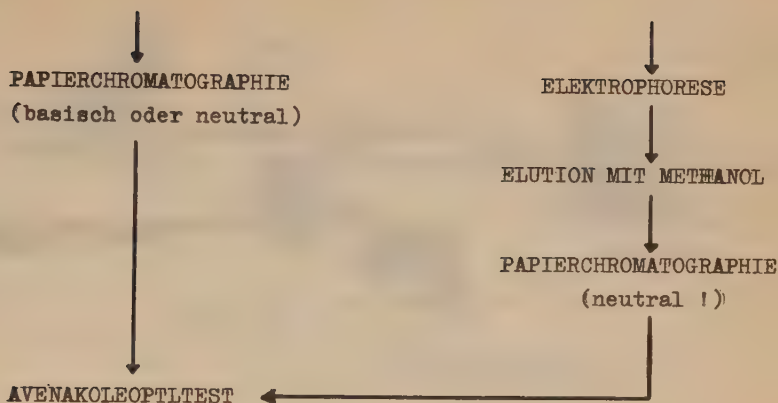


41

Abb. 39-41: Die Wirkung von Ätherfraktionen aus ätherischen Extrakten im Biotest.

39: Extrakt aus 1480 Spitzen in I/A/W chromatographiert.

40-41: Extrakt aus 1480 Spitzen halbiert, eine Hälfte in I/A/W (40), zweite Teilfraktion in I/W (41) getrennt.



Die bei Äther- und Alkoholextrakten besonders störenden Hemmstoffe können mit Hilfe einer einfachen Technik, der neutralen PC in Verbindung mit einer Hochspannungselektrophorese, vom Auxin getrennt werden.

1. EXTRAKTION MIT 70 %igem ÄTHYLALKOHOL

Die papierchromatographische Trennung der Ätherfraktion äthanolischer Ausgangsextrakte erfolgt in I/A/W (10:1:1) und in I/W (10:1). Der unterschiedliche Wert beider Trennmethoden dokumentiert sich im physiologischen Test. Während auf basisch getrennten Chromatogrammen die IES-Position (RF 0.2-0.4) wachstumsfördernd wirkt (Abb. 39 und 40), das Wachstum der Testsegmente wird um 80 % gegenüber nur 36 % der Kontrolle gefördert, reagiert der entsprechende Bereich neutral entwickelter Chromatogramme stark wachstumshemmend. Das Segment 0.6-0.7 verursacht sogar eine totale Hemmung des Wachstums der Testsegmente (Abb. 41).

Die durch das basische Lösungsmittel vollzogene Trennung von Auxin und Hemmstoff, die Hemmstoffe verbleiben am Startpunkt, unterbleibt bei neutraler Chromatographie.

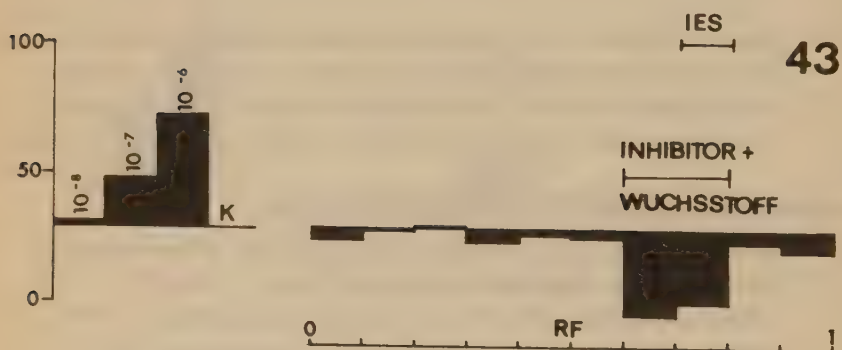
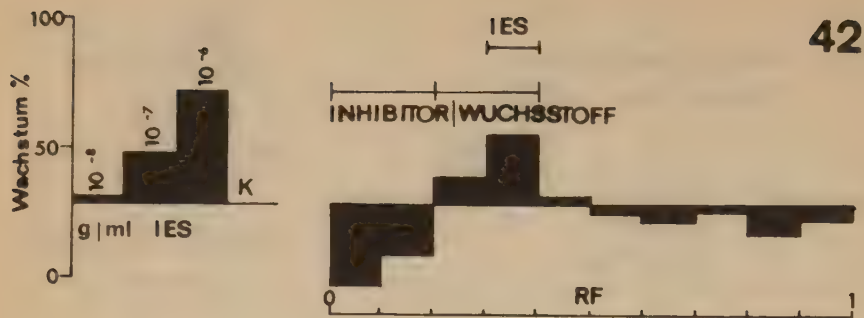


Abb. 42 und 43

1590 Koleoptilspitzen mit Äther extrahiert, Fraktionen halbiert: Eine Hälfte mit I/A/W (42), die zweite Hälfte in I/W chromatographiert.

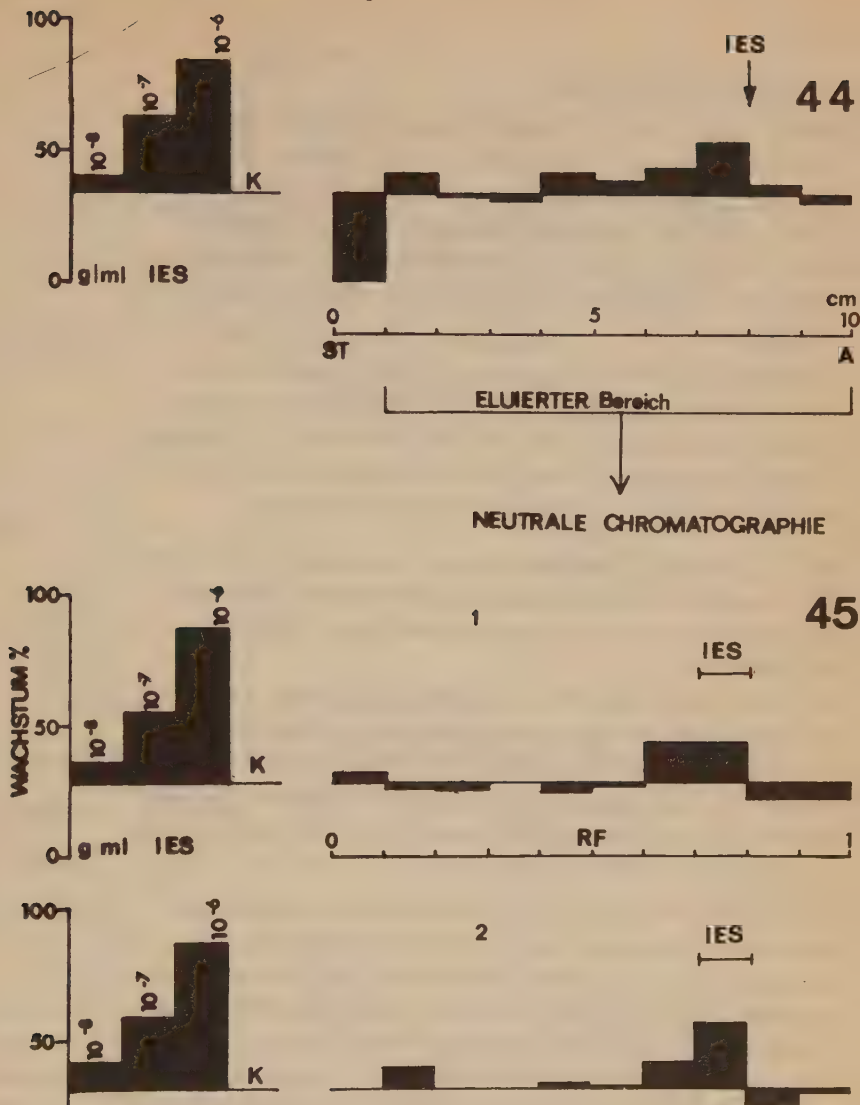


Abb. 44 und 45

44: Wachstumsdiagramm eines elektrophoretisch getrennten Ätherextraktes aus 1500 Spitzen.

45: Ätherextrakte aus 1600 (45/1) bzw. 1570 (45/2) Spitzen durch Elektrophorese vorgereinigt, Elution ohne Hemmstoffe, Rückchromatographie in I/W (10:1) und Biotest der Chromatogramme (Abb. 45).

2. DIE ÄTHEREXTRAKTION

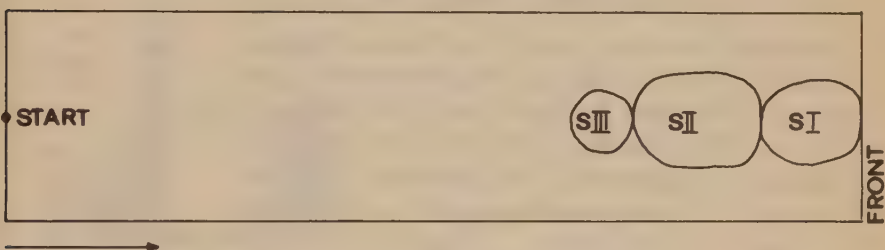
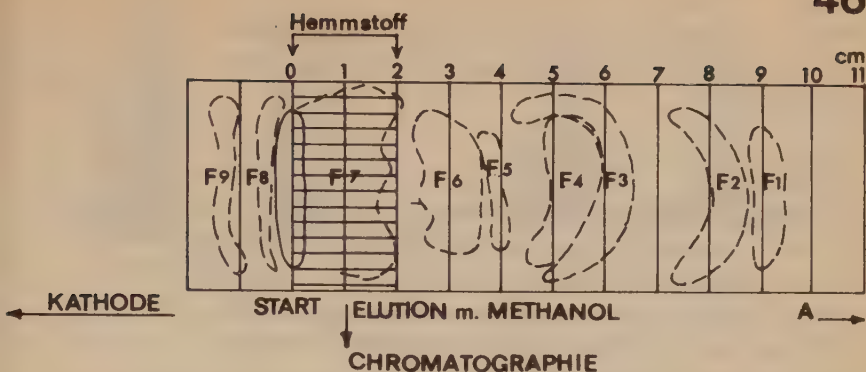
Werden bereits mit 70 %igem Äthanol ungleich mehr Hemmstoffe als mit Wasser erfaßt, so trifft das für ein rein lipophiles Lösungsmittel, wie es Äther darstellt, in noch größerem Maße zu. Die in äthanolischen Extrakten bereits störenden lipophilen Hemmstoffe treten in Ätherextrakten in noch höherer Konzentration auf.

Im übrigen gelten die gleichen Verhältnisse wie für die äthanolischen Extrakte: Auxinaktivität auf basischen Chromatogrammen in der IES-Position, im entsprechenden Bereich bei neutraler Chromatographie totale Wachstums hemmung im Biotest (Abb. 42 und 43).

Mit Hilfe einer Kombination aus Papierelektrophorese und neutraler Chromatographie gelingt die Trennung der Hemmstoffe von der nativen IES ohne Verwendung von Ammoniak.

Der physiologische Test des Papierstreifens eines elektrophoretisch getrennten Ätherextraktes zeigt bereits positive Resultate. Die Hemmstoffaktivität beschränkt sich auf den Startbereich, während in und unterhalb der IES-Position Auxinaktivität registriert werden kann (Abb. 44).

Der größte Teil der Trennstrecke (ohne Hemmstoffe) wurde mit Methanol, dann mit Äther extrahiert (Abb. 44), das Eluat neutral chromatographiert und getestet. Die Segmente 0.6-0.8 (IES 0.7-0.8) wirken jetzt auf die Testsegmente wachstumsfördernd (Abb. 45/1-2). Mit $\text{FeCl}_3/\text{HClO}_4$ spricht dieser Bereich mit der typischen Indolfärbung für IES an; der genaue Wert beträgt 0.68. Gemessen an der biologischen Aktivität von Wasserdiffusaten ist, bei gleichem Ausgangsmaterial, die Auxinaktivität um mindestens 50 % reduziert. "A2" ist in zwei



UV - Fluoreszenz		Farbreaktion mit				
EZ.	ohne NaOH	mit NaOH	p - Nitralin	AgNO ₃	FeCl ₃	Pauly's - R
I	hellblau	hellblau	rot	gelb	hellgelb	gelbbraun
II	rotviolett	blau	rot	braun	blau	rotbraun
III	grauviolett	—	—	—	—	violettbraun

Abb. 46: Elektrophorese eines Ätherextraktes. Hemmstoffe am Auftragungspunkt eluiert (oben i. Bild) und Rückchromatographie in Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5).

Unten: UV-Fluoreszenz und Farbreaktionen der mit S I, S II und S III bezeichneten Hemmstoffe, F₁ - F₉ Fluoreszenzbereiche.

Versuchen nachweisbar (Abb. 44, 45/2). Die Zuwachsraten sind gegenüber der Kontrolle signifikant (P unter 0.0027).

3. HEMMSTOFFE

Anhand der braunen bis braunschwarzen Verfärbung der Hemmstoffe im ammoniakalischen System, einer typischen Reaktion reduzierend wirkender Substanzen mit Ammoniak, kann auf einen phenolischen Charakter der Hemmstoffe geschlossen werden. Diese sauren Hemmstoffe verbleiben bei elektrophoretischer Trennung am Startpunkt.

In einfachen Versuchen wurden die Hemmstoffe aus elektrophoretisch getrennten Ätherextrakten durch Elution mit Methanol (1h) und Äther (30 Minuten) von den übrigen Bestandteilen isoliert (Abb. 46), die Lösungsmittel entfernt und der Rückstand in wenig Äther für die Papierchromatographie in Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5) gelöst.

Unter UV-Licht lassen sich drei fluoreszierende Flecken auf dem Chromatogramm abgrenzen: SI fluoresziert leuchtend hellblau, SII rotviolett und SIII graurot (Abb. 46). Zwei dieser Substanzen, S I und S II, geben Farbreaktionen mit mehr oder weniger für Phenole typischen Nachweisreagenzien. Das nicht besonders empfindliche, dafür aber für Phenole spezifische Eisen-III-chloridreagens soll nur mit Trioxyphenolen eine grau bis blaue Farbschattierung geben (PROCHÁZKA 1958). Danach kann S II dieser Gruppe zugeordnet werden. Die dunkelbraune Anfärbung von S II nach Behandlung mit ammoniakalischer Silbernitratlösung deutet gleichfalls auf die Anwesenheit mehrerer Hydroxylgruppen im Molekül hin (PROCHÁZKA 1958). S I ist gleichfalls als Phenol anzusprechen, während S III offensichtlich nicht zu dieser Verbindungs-

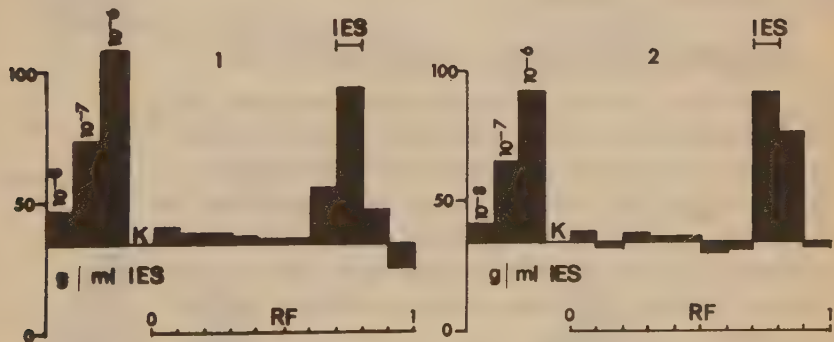
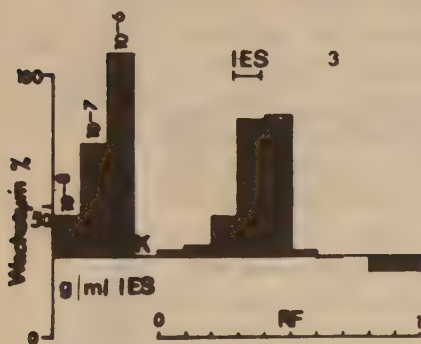
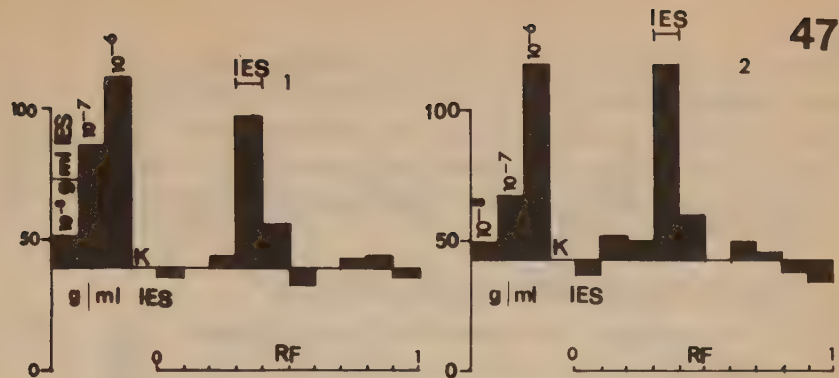


Abb. 47 und 48 Wachstumsdiagramme von Chromatogrammen synthetischer IES ($5 \times 10^{-6} \text{ g}$). 47/1-3 basische, 3 Versuche, 48/1-2 neutrale Chromatographie (2 Versuche).

klasse gezählt werden kann. Bei der gegenseitigen Überlagerung dieser Inhibitoren ist es nicht möglich, eine Differenzierung anhand der biologischen Wirksamkeit zwischen diesen Komponenten vorzunehmen, d.h. es ist ungewiß, ob allen drei Komponenten Hemmstoffeigenschaften zukommen.

III. NATIVE IES IN DIFFUSATEN UND EXTRAKTEN

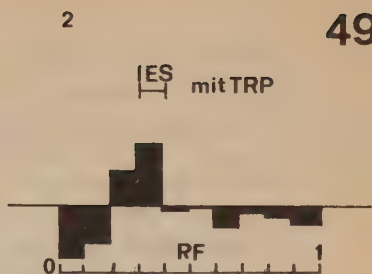
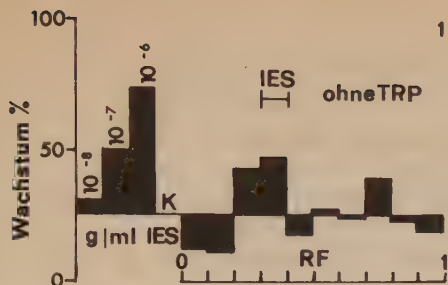
An der Existenz der IES in Wasserdiffusaten, Agardiffusaten, Äther- und Alkoholextrakten ist nicht zu zweifeln. Es ist aber keineswegs sicher, ob nicht zumindest ein Teil dieser IES während der Aufarbeitung enzymatisch, in erster Linie käme Tryptophan in Frage, aus gebundenem Auxin entsteht.

Der für die beiden Methoden - Extraktion, Diffusion - erforderliche Zeitaufwand ist wenig unterschiedlich. Andere Verhältnisse gelten für die Versuchstemperatur bei Diffusions- ($t = 25^{\circ}\text{C}$) und Extraktionsversuchen ($t = 2-4^{\circ}\text{C}$). Daher erscheint die enzymatische Entstehung von IES aus Tryptophan auf Grund der Versuchstemperatur von 25°C in den Diffusionsversuchen von vornherein begünstigt.

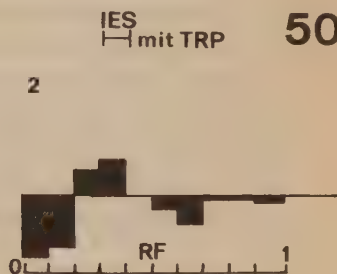
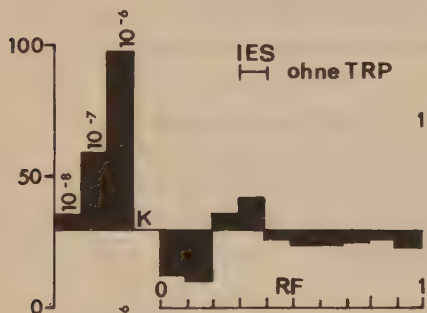
1. DIE PAPIERCHROMATOGRAPHIE SYNTHETISCHER IES

Die Möglichkeit einer Artefaktbildung zwischen IES und Ammoniak ist bereits angedeutet worden. Dieses Problem verdient deshalb besondere Aufmerksamkeit, weil es nicht ohne Bedeutung für die Beurteilung der Frage ist, ob das "A2" ein echtes Produkt des Auxinstoffwechsels der Koleoptile darstellt oder nur als Artefakt während der Papierchromatographie aus IES entsteht.

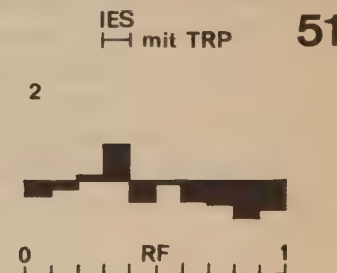
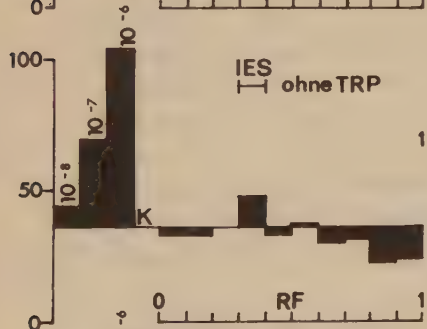
10^{-6} bis 5×10^{-6} g IES werden mit I/W bzw. I/A/W chromatographiert und die Papierstreifen im Biotest geprüft. Die Auxinaktivität beschränkt sich ausschließ-



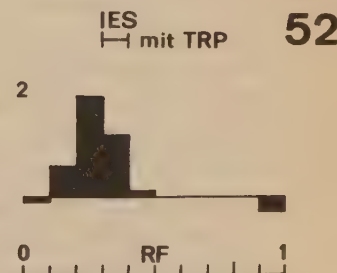
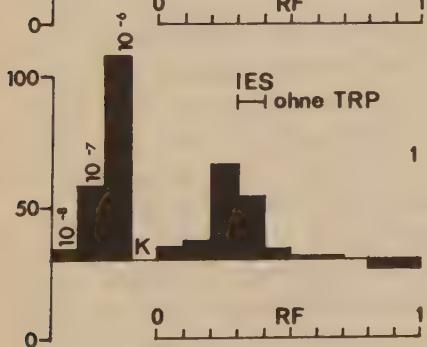
49



50



51



52

Abb. 49 - 52

Zusatz von Tryptophan zu Extrakten und Diffusaten.

49: 2 x 800 Koleoptilspitzen mit 70 %igem Äthanol extrahiert. 49/1 ohne, 49/2 mit Tryptophanzusatz. Wachstumsdiagramme der in I/A/W chromatographierten Ätherfraktionen dieses Extraktes.

50/1-2: Parallelversuch. 2 x 700 Koleoptilspitzen, sonst wie unter Abb. 49.

51: 4-stündige Diffusion von 2 x 750 Koleoptilspitzen in Wasser. 1. Teilansatz ohne (51/1), Parallelansatz mit Tryptophanzusatz (51/2).
Wachstumsdiagramm der in I/A/W chromatographierten Ätherfraktionen der Wasserdiffusate.

52/1-2: Parallelversuch, 2 x 800 Koleoptilspitzen, sonst wie unter Abb. 51.

lich auf den IES-Bereich, keinerlei Anzeichen sprechen für Artefaktbildung oder eine Zerstörung der IES (Abb. 47 und 48). Geringfügige Abweichungen vom Nullwert in den übrigen Segmenten erklären sich aus Schwankungen der Kontrolle.

2. DIE ENZYMATISCHE BILDUNG VON IES AUS TRYPTOPHAN

Das aus 1500 Koleoptilen bestehende Material wird zunächst halbiert. 750 Koleoptilspitzen kommen in 20 ml 70 %iges Äthanol, dem 2 mg Tryptophan zugesetzt werden, während der zweite Teil des Pflanzenmaterials mit dem gleichen Lösungsmittel, aber ohne Tryptophanzusatz, extrahiert wird. Ähnlich wird mit geteilten Wasserdiffusaten verfahren. Zwecks Entfernung möglicher IES-Verunreinigungen ist das Tryptophan vor der Verwendung wiederholt mit Äther gewaschen worden.

In keinem Versuch, weder in Extrakten (Abb. 49 und 50) noch bei Diffusaten (Abb. 51 und 52), kann gegenüber den Kontrollen eine gesteigerte IES-Aktivität registriert werden, d.h. die enzymatische Bildung von IES aus Tryptophan während der Aufarbeitung hat unter den herrschenden Versuchsbedingungen keinen erkennbaren Einfluß auf die Auxinausbeute.

IV. INKUBATIONSVERSUCHE

Für Wasserdiffusate kann die Entstehung von IES aus "A2" gezeigt werden (vergl. S. 36). Zugleich sprechen aber auch Anhaltspunkte für eine Reaktion in umgekehrter Richtung, d.h. der "A2"-Entstehung aus IES, denn in einem Versuch steigert synthetische IES in Verbindung mit Wasserdiffusaten die "A2"-Aktivität gegenüber der Kontrolle beträchtlich (S. 46). Ausgehend von diesen Tatsachen liegt es nahe, dem pflanzlichen Gewebe durch Zuführung synthetischer IES die Möglichkeit einer vermehrten "A2"-Produktion

zu geben.

Das Versuchsmaterial bilden 4 mm lange, 3 mm unterhalb der Sproßspitze herauspräparierte Segmente.

PRÄPARATION

80 SEGMENTE IN 20 ml INKUBATIONSLösUNG
(10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} g/ml IES, KONTROLLE OHNE IES)

↓
4- ODER 20-STÜNDIGE INKUBATION

↓
GEWEBE UNTER CO₂-SCHNEE ZERMÖRERN,
HALBSTÜNDIGE EXTRAKTION MIT

↓
ÄTHER

↓
70 % ÄTHANOL

↓
WASSER

↓
FILTRATION

↓
FILTRATION

↓
FILTRATION

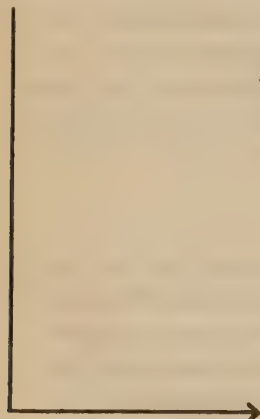
↓
ABDAMPFEN DES
ÄTHANOLS

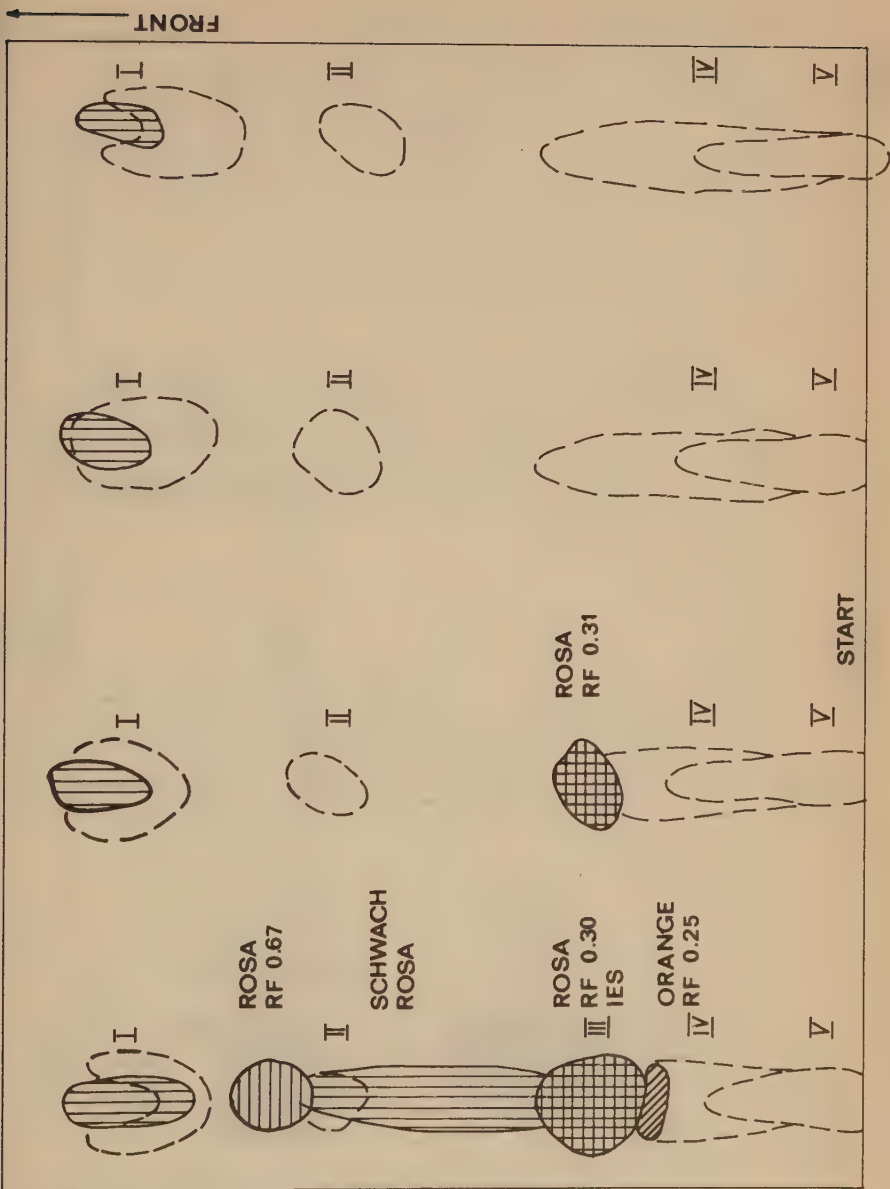
↘
RÜCKSTAND BZW. WASSERFRAKTION
AUF PH 2.8 - 2.9

↓
EXTRAKTION MIT ÄTHER

↓
ÄTHERFRAKTIONEN ZUR TROCKNE

↓
PAPIERCHROMATOGRAPHIE

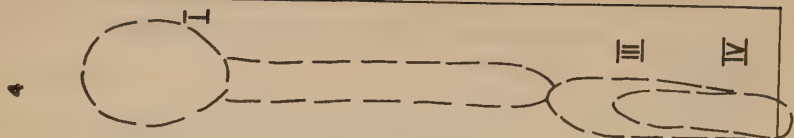
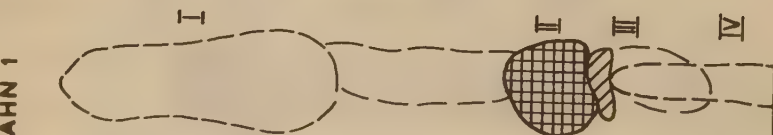




54

FRONT

BAHN 1



START

BAHN 1



I

II

ROSA

RF 0.72

ORANGE

RF 0.69

III

2



I

II

III

3

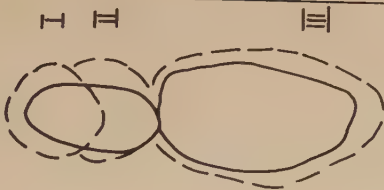


I

II

III

4



I

II

III

IV

VIOLETT

RF 0.38

IAAS



START

56

FRONT

BAHN 1

I II

ROSA

RF 0.72

ORANGE

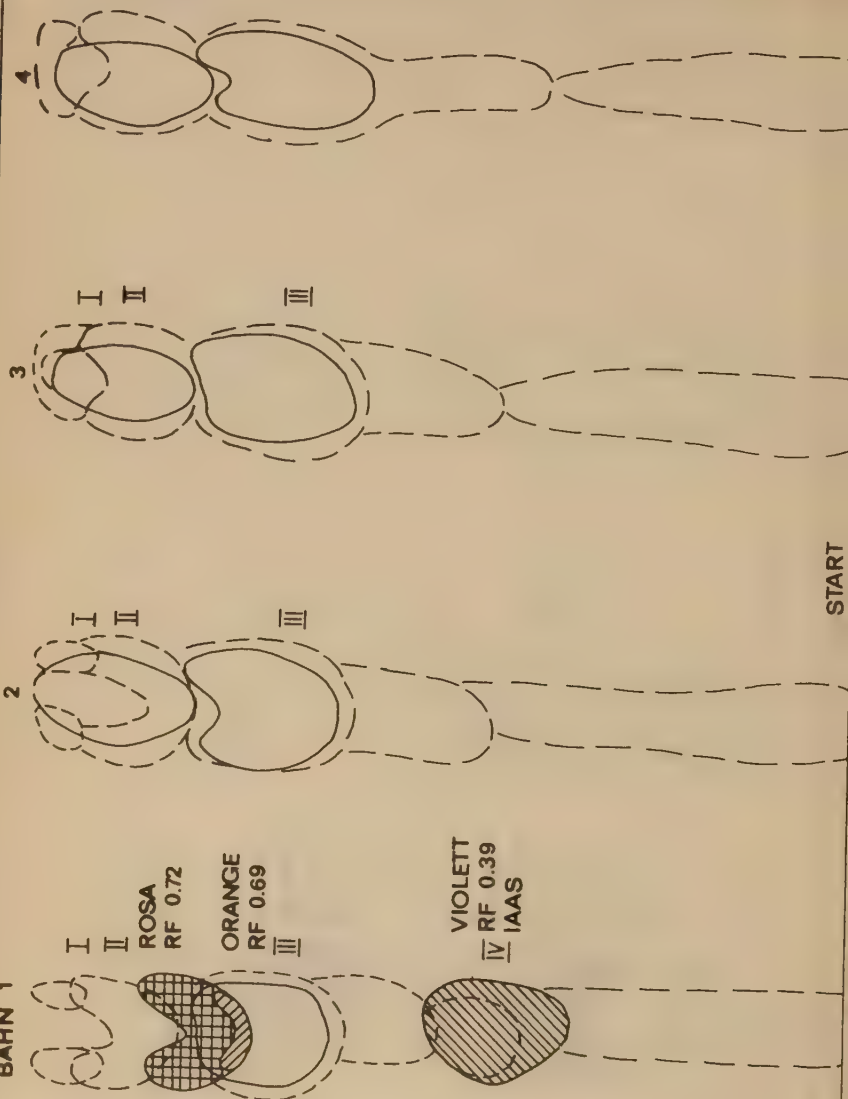
RF 0.69

III

VIOLETT

RF 0.39

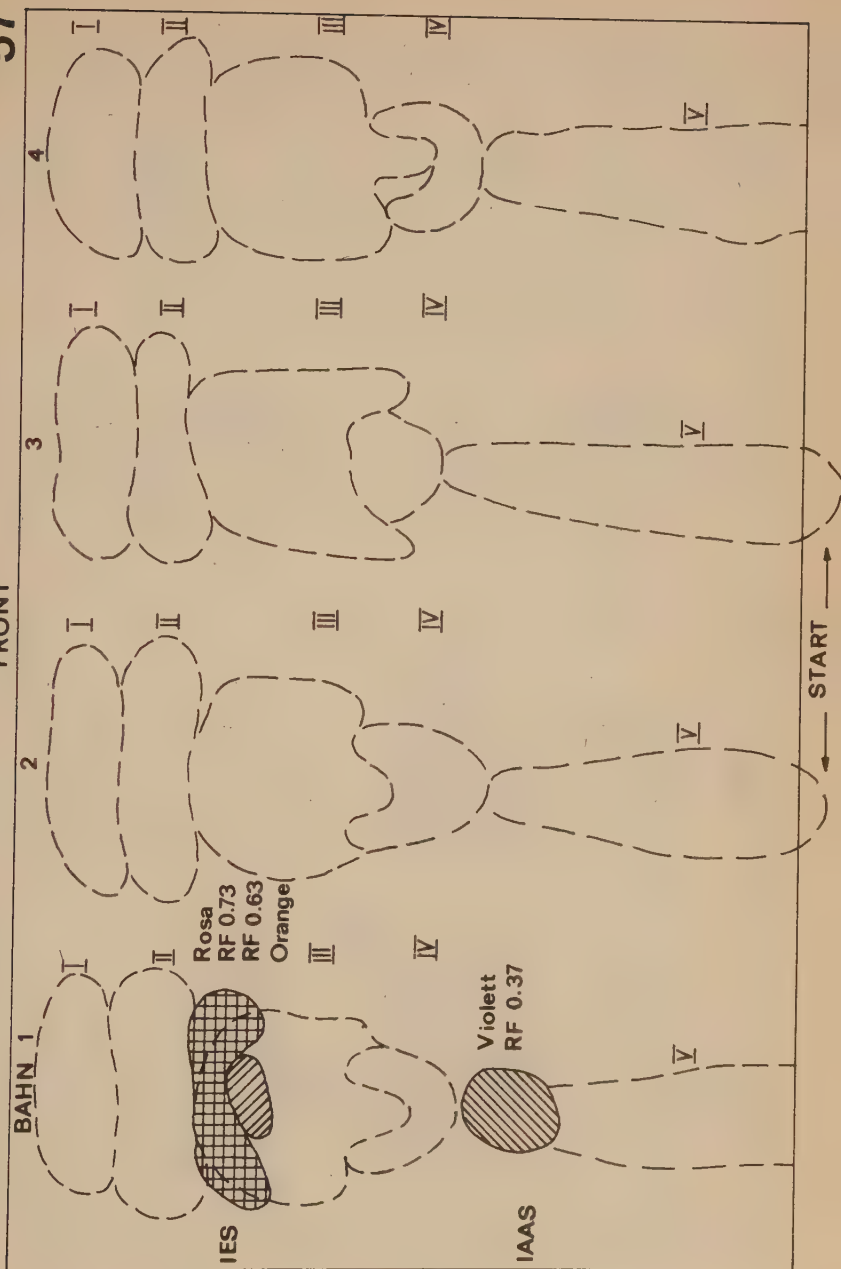
IV IAAS



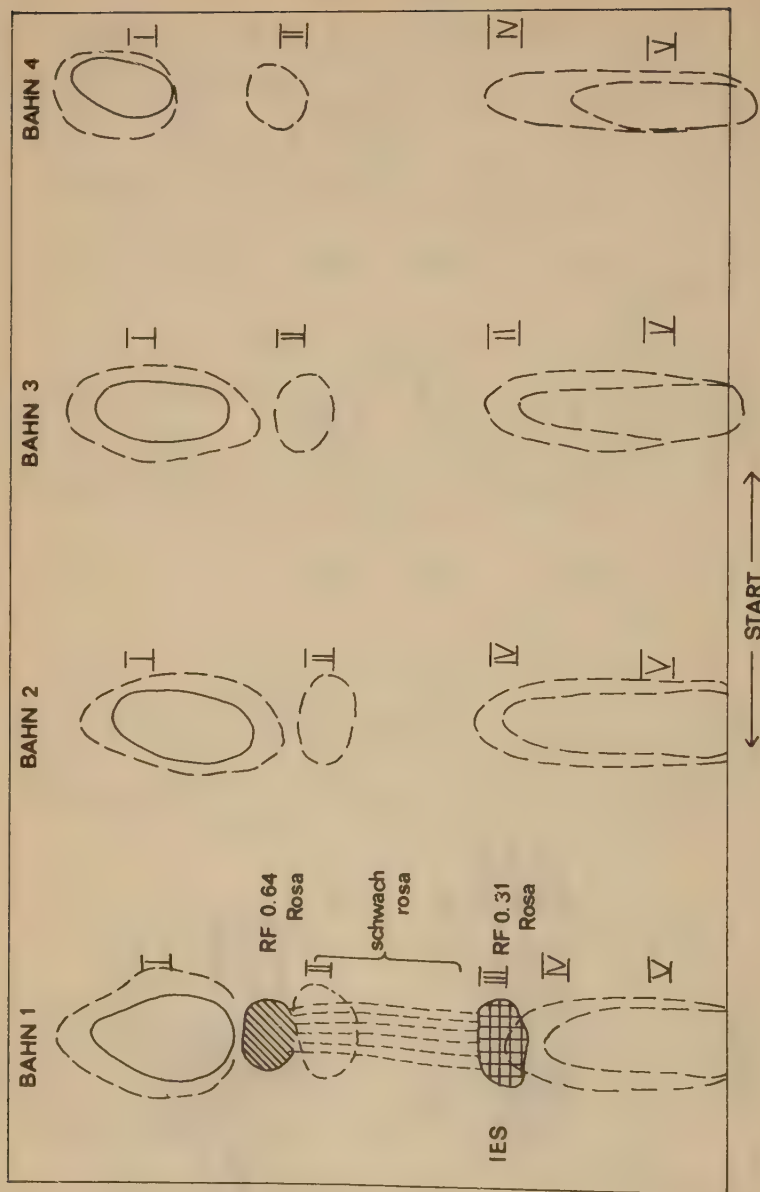
START

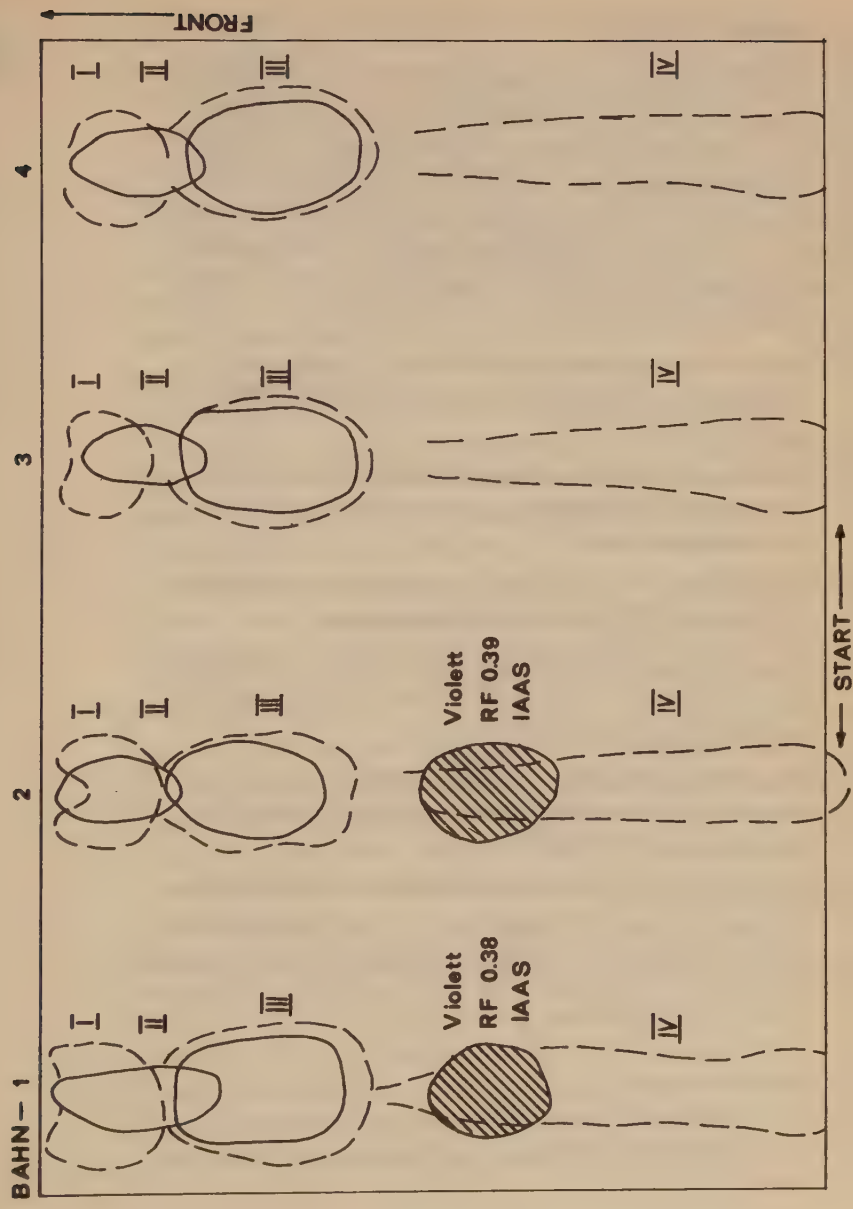
57

FRONT



FRONT





Abbildungen 53 - 59

Papierchromatogramme von Extrakten aus 4 mm-Koleoptilsegmenten, die mit IES unterschiedlicher Konzentrationen behandelt wurden. Ausgangskonzentrationen des Inkubationsmediums: 10^{-4} g/ml IES (Bahn 1), 10^{-5} g/ml (Bahn 2), 10^{-6} g/ml (Bahn 3), Kontrolle ohne IES (Bahn 4); --- Fluoreszenzbereiche unter UV-Bestrahlung, schraffierte Flecken - Farbreaktionen mit Salzkowskireagens ($\text{FeCl}_3/\text{HClO}_4$).

- 53: Papierchromatogramm eines Ätherextraktes aus 80 Segmenten (4-stündige Fütterung), Laufmittel I/A/W (10:1:1).
- 54: Ätherfraktion eines Wasserextraktes aus 80 Koleoptilsegmenten (4-stündige Inkubation) in I/A/W chromatographiert.
- 55: Ätherextrakt aus Koleoptilsegmenten (4-stündige Inkubation) in I/W chromatographiert.
- 56: Papierchromatogramm der Ätherfraktion eines Alkoholextraktes (4-stündige Inkubation) aus 80 Segmenten, Laufmittel I/W (10:1).
- 57: Papierchromatogramm der Ätherfraktion eines wässrigen Extraktes (4-stündige Inkubation), Laufmittel I/W (10:1).
- 58: Ätherfraktion eines Wasserextraktes (20-stündige Inkubation) aus 80 Segmenten in I/A/W getrennt.
- 59: wie unter Abb. 58, jedoch in I/W chromatographiert.

1/1 RESULTATE DER 4-STÜNDIGEN INKUBATIONSPERIODE

Auf den Chromatogrammen von Extrakten IES-behandelter Sproßsegmente kann grundsätzlich zwischen vier sal-kowskipositiven Substanzen, IES, IAAS, ICS und IAAM, unterschieden werden. Abgesehen von der Konzentration der Inkubationslösung, welche für die Ergebnisse wichtig ist, hat die Wahl des Laufmittels bei der PC einen großen Einfluß auf die Resultate, während es praktisch bedeutungslos ist, ob mit Äther, Wasser oder Äthanol extrahiert wird.

β -Indolylessigsäure

IES findet sich auf Bahn 1 (Basallösung 10^{-4} g/ml IES) basisch und neutral entwickelter Chromatogramme, auf Bahn 2 (10^{-5} g/ml) hingegen nur auf basischen Papieren (Abb. 53 -57). Die Kontrollstreifen auf Bahn 4 geben keine Anfärbung.

Ausschließlich auf Bahn 1 tritt ein mit dem Reagens orange reagierendes Stoffwechselprodukt auf. Farb-reaktion, RF in I/W (0.69) und I/A/W (0.25) stimmen mit den für Indol-3-Carboxylsäure (ICS) bekannten Daten überein.

Als zweites Produkt kann Indolacetylasparaginsäure (IAAS) anhand der violetten Farbreaktion und des RF-Wertes (0.37-0.39) im neutralen System identifiziert werden (Bahn 1 der Abb. 55-57). Im ammoniakalischen System (theoretischer Wert 0,05) ist sie nicht nachweisbar.

Die qualitativen Unterschiede in den Ergebnissen zwischen basisch und neutral getrennten Extrakten beruhen auf der streckenweise starken Überlagerung durch kräftig gelbbraun gefärbte Phenole bei der Papierchromatographie. Auf neutral getrennten Papierchromatogrammen überdecken sie den IES-Bereich, im basischen System aber die Position der IAAS in un -

mittelbarer Nähe der Ausgangsposition. Die IES - Färbung wird bereits kurz nach der Behandlung mit dem Reagens erkennbar, während die schwarzviolette Verfärbung der Phenole mit $\text{FeCl}_3/\text{HClO}_4$ längere Zeit beansprucht. Nur so ist es überhaupt möglich, die IES-Position auch auf neutral getrennten Chromatogrammen abzugrenzen. Das gelingt allerdings nur auf Bahn 1 (höchste Inkubationskonzentration). Etwa 30 Minuten nach dem Aufsprühen der Lösung wird auch hier die angefärbte IES von der Phenolreaktion überlagert.

1/2. 20 STUNDEN - INKUBATION

Nach 4-stündiger Inkubation der Sproßsegmente findet sich auf Bahn 1 immer IES. Für das 20-stündige Inkubationsintervall gelten andere Verhältnisse. Hier tritt IES ausschließlich auf basischen Chromatogrammen auf (Bahn 1 der Abb. 58), IAAS nur auf neutralen Papieren (Bahn 1 und 2 in Abb. 59). Wie aus der kräftig violetten Farbreaktion der IAAS mit $\text{FeCl}_3/\text{HClO}_4$ und dem Auftreten dieses Produktes auch in Bahn 2 geschlossen werden kann (Abb. 59 und Tabelle 3), schreitet die Konjugation der IES mit Asparaginsäure während der langen Periode weiter fort.

Tabelle 3

Stoffwechselprodukte der IES nach 4- bzw. 20-stündiger Inkubation.

INKUBATION IN STUNDEN	IES-BASALLÖSUNG (g/ml)	GEFUNDEN NACH CHROMATOGRAPHIE	
		IN I/A/W(10:1:1)	I/W (10:1)
4	10^{-4}	IES, ICS, IAAM	IES, IAAS, ICS
	10^{-5}	IES - -	- - -
	10^{-6}	- - -	- - -
	KONTROLLE	- - -	- - -
20	10^{-4}	IES, ICS, IAAM	- IAAS -
	10^{-5}	- - -	- IAAS -
	10^{-6}	- - -	- - -
	KONTROLLE	- - -	- - -

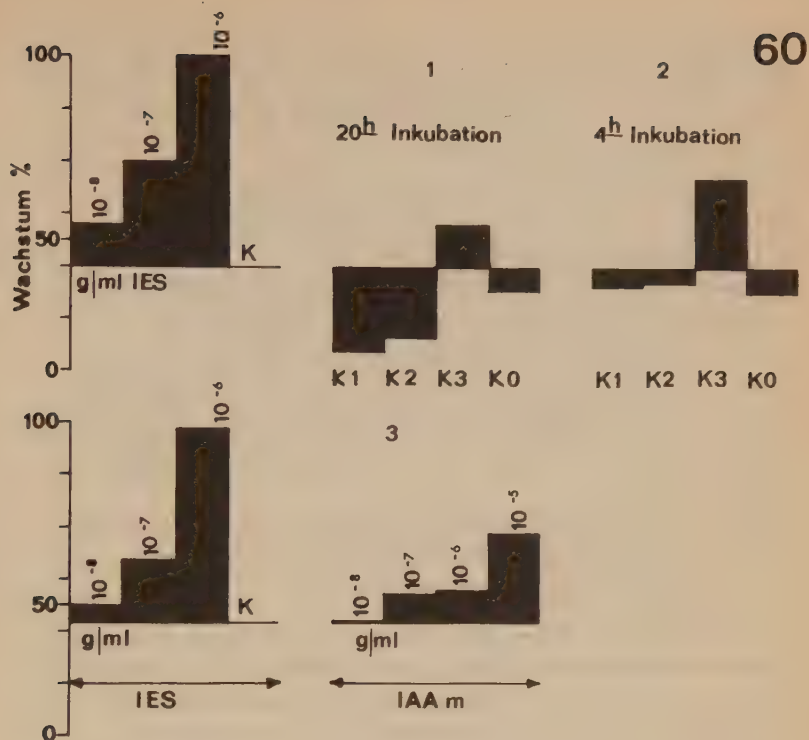


Abb. 60

60/1 und 60/2: 4-stündige (60/2) bzw. 20-stündige Inkubation von 4 x 80 Koleoptilsegmenten in 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} g/ml IES oder in Wasser (Kontrolle).

"A2"-Segmente (0.6-0.8) der in I/A/W getrennten Ätherfraktionen (Wasserextraktion) mit Methanol/Äther eluiert, Eluate hydrolysiert, Hydrolyseprodukte in Äther gelöst und biogetestet. K1 - 10^{-6} , K2 - 10^{-5} , K3 - 10^{-4} g/ml IES (Inkubationskonzentration), K0 - Kontrolle.

60/3: IES und IAAm (Reinsubstanzen) im Avenatest. Fördernde Wirkung unterschiedlicher Konzentrationen.

Auxin 2-Position. An dieser Stelle sei an die Ausgangsbasis der Inkubationsversuche erinnert. Es soll eine "A2"-Anreicherung durch IES-Gaben im lebenden Gewebe induziert werden.

Neutral getrennte Chromatogramme lassen im "A2"-Bereich (0.1-0.3) in keinem Fall mit Salkowskireagens eine Anfärbung erkennen. In zwei von drei Versuchen mit dem basischen System gibt hingegen der RF-Bereich 0.64-0.67 mit $\text{FeCl}_3/\text{HClO}_4$ eine rosa Färbung. Die Strecke zwischen diesem Fleck und der IES ist in gleicher Weise schwach angefärbt (Abb. 53 und 58). Das Produkt tritt ausschließlich auf Bahn 1 auf (10^{-4} g/ml IES-Basallösung). RF und Farbreaktion sprechen gegen eine Identität mit "A2" (RF 0.7-0.9), beide Kriterien stimmen aber mit Indolacetamid (IAAm) überein, für das sich in I/A/W RF-Werte von 0.6-0.7 ergeben und das mit $\text{FeCl}_3/\text{HClO}_4$ rosa reagiert.

Als nächstes ist daher die biologische Wirkung von IAAm im Avenakoleoptilttest geprüft worden. In einer Konzentration von 10^{-8} g/ml gibt IAAm im Test keine Förderung, 10^{-7} und 10^{-6} g/ml IAAm sind im Vergleich zur IES nur schwach aktiv. Erst 10^{-5} g IAAm bringen eine weitere Wachstumssteigerung, die aber, gemessen an der Wirkung einer äquivalenten IES-Lösung, nur eine geringe Wirkung zeigt (Abb. 60/3).

Nunmehr werden die RF-Segmente 0.6-0.9 aller vier Bahnen zweier basisch entwickelter Chromatogramme (Ätherfraktionen von Wasserextrakten, 4- bzw. 20-stündige Fütterung) 1h mit Methanol, dann 30 Minuten mit Äther extrahiert und die Lösungsmittel der vereinigten Fraktionen unter reduziertem Druck entfernt. Nach Zugabe von 10 ml Wasser folgt eine halbstündige Hydrolyse bei 45°C ; dann wird abgedampft, der Rückstand in Testpufferlösung aufgenommen und im Biotest auf Aktivität geprüft. Nur der Extrakt aus Bahn 1

(10^{-4} g/ml IES-Basallösung) verfügt über wachstumsfördernde Aktivität im Test (Abb. 60/1-2), die nach 4-stündiger Inkubation größer als nach der langen Periode ist. Diese Aktivitäten sind 10^{-6} und 10^{-5} g IAAM äquivalent. Eine derartig hohe IAAM-Konzentration sollte mit dem Reagens auf dem Papier eine deutlich sichtbare Farbreaktion geben. Das trifft in der Tat zu (Abb. 53 und 58). Die umgekehrt anhand der Fleckengröße, der Farbtintensität ($= 10^{-6}$ g IAAM) und der biologischen Aktivität synthetischen Amids erwarteten Zuwachsraten werden tatsächlich im Test erreicht (Abb. 60/1-2). Färbung, Rf-Wert und biologische Wirksamkeit stimmen somit genau mit den Eigenschaften von Indolacetamid überein.

Quantitativ-kolorimetrische Bestimmung der IES

Es ist bei Inkubationsversuchen wichtig, über die Veränderungen des IES-Gehaltes der Inkubationslösung sowie über die Menge der aufgenommenen IES orientiert zu sein. Die Differenz beider Größen dient als Maßstab für Umbau und Zerstörung der IES.

Die quantitative Bestimmung der IES erfolgte nach der Methode von GORDON und WEBER (1951). Leider erlaubt dieser Test nur die Bestimmung von IES-Mengen bis zu 5×10^{-6} g, so daß seine Anwendung nur auf die hochkonzentrierten (daher unphysiologischen!) Lösungen begrenzt ist. Das bedeutet, nur die Anfangs- und Endwerte der höchsten Konzentrationsstufe (10^{-4} g/ml IES) können sicher ermittelt werden.

Bei der kolorimetrischen Bestimmung wird 1 ml IES-Lösung mit 2 ml Salkowskireagens versetzt und die Extinktion der Probe nach einer halbstündigen Wartezeit bei 5300 Å im PMQ (ZEIS) bestimmt. Eichkurven mit synthetischer IES liefern die den Extinktionen entsprechenden IES-Konzentrationen (Abb. 61 und 62).

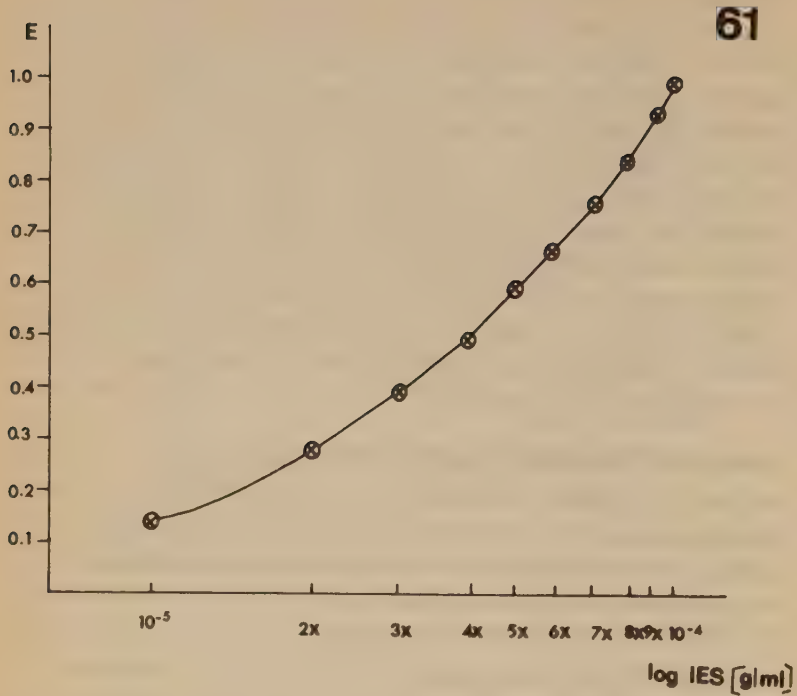


Abb. 61

IES-Standard (Eichkurve I) zur quantitativen Bestimmung unbekannter IES-Konzentrationen.

Ordinate: Extinktion E bei 5300 Å (1 ml IES-Lösung + 2 ml $\text{FeCl}_3/\text{HClO}_4$).

Abszisse: Logarithmus der IES-Konzentration.

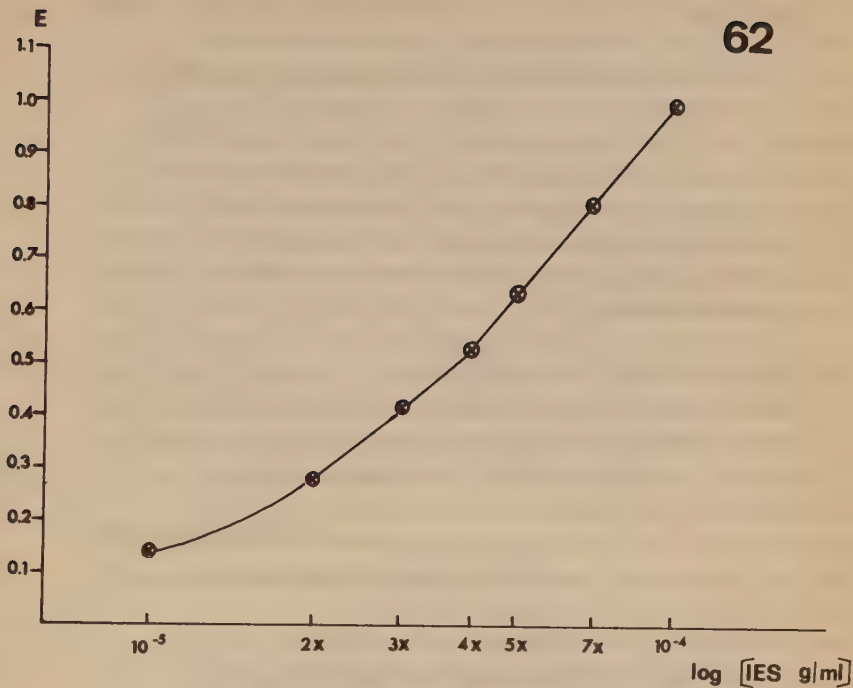


Abb. 62

IES-Standard (Eichkurve II) zur quantitativen Bestimmung unbekannter IES-Konzentrationen.

Ordinate: Extinktion E bei 5300 Å

Abszisse: Logarithmus der IES-Konzentration

Abnahme des IES-Gehaltes der Basallösung

Im Basalmedium mit der höchsten IES-Konzentration (10^{-4} g/ml) sinkt der IES-Gehalt nach vierstündiger Inkubationsdauer um 20-30 %, während nach der langen Periode (20 h) sogar eine 90 %ige Abnahme zu verzeichnen ist. Hier verschwinden, bei einem Inkubationsvolumen von 20 ml/80 Segmenten ($= 20 \times 10^{-4}$ g = 2 mg IES), immerhin 1,8 mg IES. In der Basallösung mit 10^{-5} g/ml IES (Stufe 2) gelingt es nicht, nach der langen Periode mit dem Test nach GORDON und WEBER noch IES zu erfassen.

Aufnahme der IES durch das Gewebe

Von Bahn 1 eines basisch chromatographierten Ätherextraktes (4-stündige Inkubation) wird die IES zuerst mit Methanol, anschließend mit Äther eluiert, die vereinigten Fraktionen unter red. Druck entfernt und der Rückstand in 2 ml Wasser aufgenommen. Die Extinktion der Probe wird nach der im vorhergehenden Abschnitt beschriebenen Methode bestimmt.

Nach vierstündiger Inkubation ist der IES-Gehalt der Basallösung um 20-30 % gesunken ($= 0,4-0,6$ mg IES, vgl. oben). Von diesem Betrag können 0,07 mg als

IES auf dem Chromatogramm wiederentdeckt werden. Das sind 12-18 % der aus der Inkubationslösung "verschwundenen" IES oder 3,5 % der "GESAMT-IES". Der größere Teil der IES (82-88 %) wird vom Gewebe in IAAS und ICS umgewandelt, mit NH_3 zu IAAM kondensiert, wahrscheinlich aber auch teilweise zu salkowskinegativen Produkten abgebaut.

20 Stunden nach Versuchsbeginn sind 90 % der IES aus der Inkubationslösung verschwunden (vgl. oben).

Von dieser IES läßt sich auf den Chromatogrammen durch die Färbungsreaktion nur ein verschwindend kleiner Teil nachweisen, der für eine quantitative

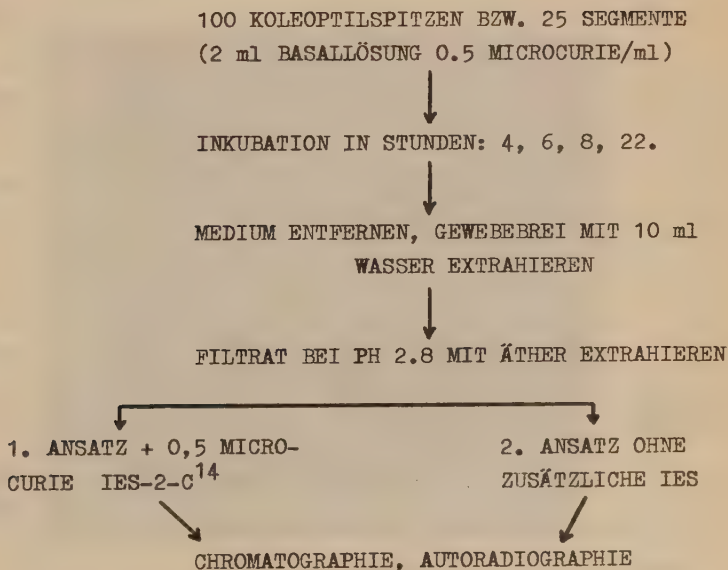
Bestimmung der IES nach der Methode von Gordon und Weber nicht mehr ausreicht.

2. FÜTTERUNG VON IES-2-C¹⁴ AN KOLEOPTILSPITZEN UND -SEGMENTE

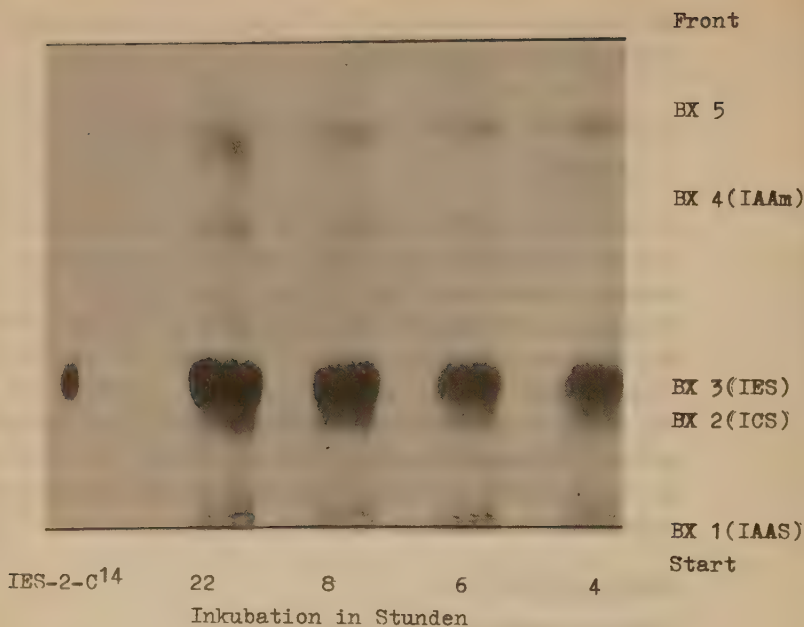
In den Inkubationsversuchen mit nicht-markierter IES (Abschnitt IV/1) können IES, IAAS, ICS und IAAM im Gewebe, jedoch kein "A2" identifiziert werden. Die Verwendung seitenmarkierter IES (IES-2-C¹⁴) gestattet die Fütterung geringerer Mengen infolge der empfindlicheren Methode der Autoradiographie. Das Material für diese Versuche bilden Koleoptilspitzen und -segmente. Die Resultate aber sind weitgehend identisch, so daß auf eine getrennte Besprechung der Ergebnisse verzichtet werden kann.

Präparationsschema

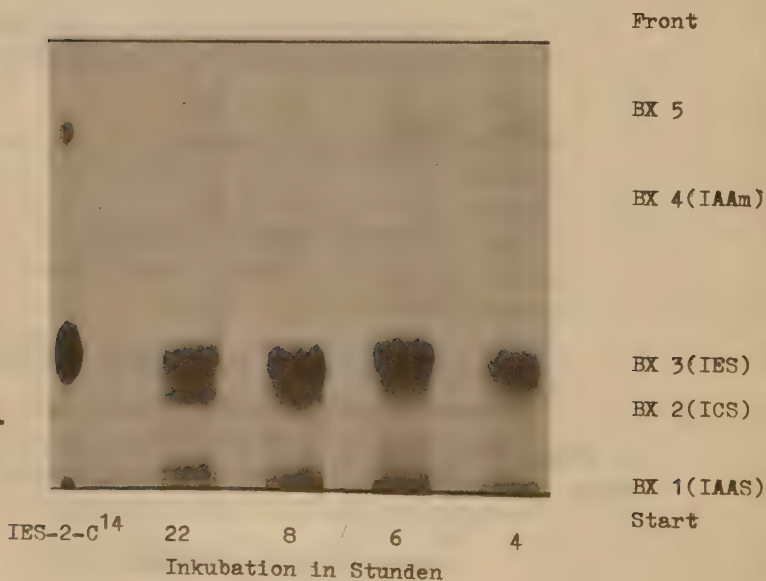
(Jeweils doppelter Versuchsansatz)



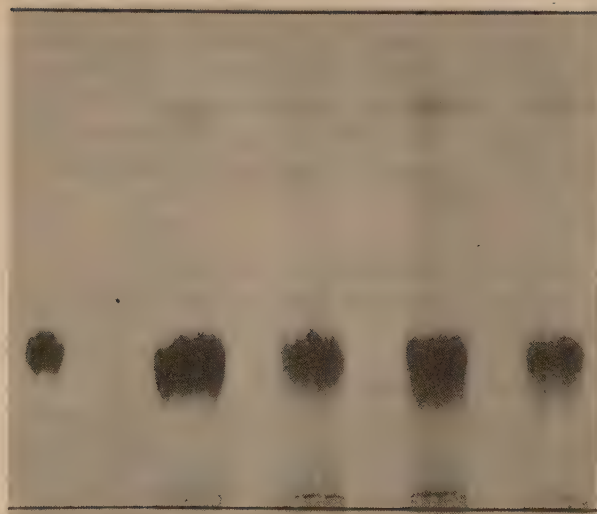
63



64



65



IES-2-C¹⁴

22

8

6

4

Inkubation in Stunden

Front

BX 5

BX 4(IAAm)

BX 3(IES)

BX 2(ICS)

BX 1(IAAS)

Start

66



IES-2-C¹⁴

22

8

6

4

Inkubation in Stunden

Front

BX 5

BX 4(IAAm)

BX 3(IES)

BX 2(ICS)

BX 1(IAAS)

Start

Abb. 63 und 64

Fütterung von Koleoptilspitzen mit IES-2-C¹⁴.

Autoradiogramme basisch (I/A/W) getrennter Ätherfraktionen von Wasserextrakten nach unterschiedlicher Inkubationszeit. Ansatz 1 (Abb. 63) mit 0,5 Microcurie zusätzlicher IES-2-C¹⁴, Ansatz 2 ohne zusätzliche IES.

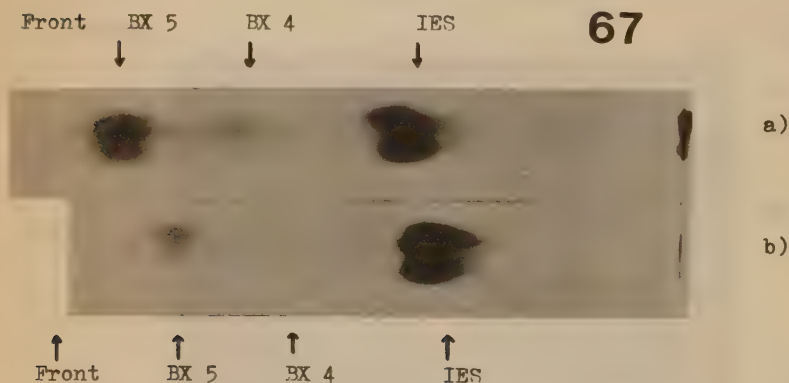
Abb. 65 und 66

Fütterung von Koleoptilsegmenten mit IES-2-C¹⁴.

Ansatz 1 (Abb. 65) mit, Ansatz 2 (Abb. 66) ohne zusätzliche IES-2-C¹⁴. Sonst wie unter 63 und 64.

Abb. 67

Chromatographie von IES-2-C¹⁴ in Isopropanol-Ammoniak-Wasser (10:1:1). BX 4 und BX 5 Zerfallsprodukte der IES (67 a). Rückchromatographie der IES (67 b) im gleichen Lösungsmittel.



Bei wechselnder Inkubationsdauer (s. Schema Seite 91) lassen sich auf basisch getrennten Chromatogrammen autoradiographisch fünf Flecken ermitteln (Abb. 63 - 66):

BX 1	Rf-Wert	0.03 - 0.04,
BX 2	"	0.20 - 0.25,
BX 3	"	0.30 - 0.32,
BX 4	"	0.60 - 0.64,
BX 5	"	0.77 - 0.82.

Ein geringer Rest an Aktivität bleibt immer an der Ausgangsbasis zurück.

BX 1 korrespondiert mit IAAS, die auf Grund der Resultate mit nicht-markierter IES auch erwartet werden kann. BX 2 dürfte mit ICS identisch sein, einem Abbauprodukt der IES. BX 3 ist Rest-IES, BX 4, meist nur schwach erkennbar, dürfte IAAM darstellen, während BX 5 nicht zu identifizieren ist. Bei unterschiedlicher Fütterungsdauer bestehen auffallend geringe Unterschiede im Schwärzungsgrad der einzelnen Flecken (Abb. 63-66). Einzig die IAAS ist mit zunehmender Versuchsdauer stärker vertreten. Insgesamt gesehen aber tritt sie nur in geringer Konzentration auf, und nur der Umstand, daß sie bei basischer PC praktisch nicht wandert, dadurch einen eng begrenzten Raum einnimmt, erlaubt ihre Identifizierung.

Die Komponenten BX 4 und BX 5 sind als chromatographische Artefakte zu werten, denn auch die PC "reiner" IES-2-C¹⁴ liefert (neben BX 3 = IES) BX 4 und BX 5. Hinzu kommt die Beobachtung, daß sie bei zusätzlichen IES-2-C¹⁴- Gaben (vergl. Seite 91) - im Gegensatz zu den Parallelansätzen (Abb. 64 und 66) - verstärkt werden (Abb. 63 und 65).

Um zu prüfen, ob BX 4 und BX 5 Verunreinigungen des Präparates darstellen oder als Produkte der ammonia-

kalischen Chromatographie entstehen, wird 1 Micro-curie IES-2-C¹⁴ mit I/A/W getrennt, die IES (RF 0,3 - 0,4) mit Methanol eluiert und im gleichen Lösungsmittel rückchromatographiert. Das Ergebnis verbessert die Situation nicht wesentlich, d.h. es erfolgt wieder der schon beschriebene Effekt der Aufspaltung der IES in die drei Komponenten BX 3 (IES) und die Artefakte BX 4 und BX 5 (Abb. 67).

Neutrale Chromatographie

Autoradiographisch sind auf mit I/W entwickelten Papieren vier aktive Substanzen erkennbar (Abb. 68-71):

NX 1	Rf-Wert	0.22 - 0.36,
NX 2	"	0.54 - 0.61,
NX 3	"	0.64 - 0.70 und
NX 4	"	0.72 - 0.78.

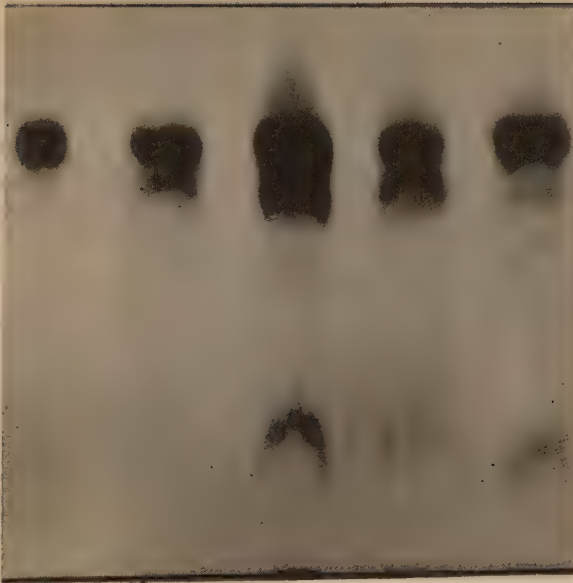
Die Rf-Werte von NX 1 schwanken verhältnismäßig stark. Das beruht auf der Neigung dieser Substanz, während der PC "Schwänze" zu bilden. Dem RF nach korrespondiert NX 1 mit IAAS. Besondere Beachtung aber verdient die Tatsache, daß in den Ansätzen, die vor der PC zusätzlich IES-2-C¹⁴ erhalten, nicht nur der IES-Fleck, sondern auch das NX 1 eine eindeutige Verstärkung erfährt (Abb. 68 und 70). Zweifel an der Identität der Komponente NX 1 mit IAAS entstehen auch aus der Beobachtung, daß die IAAS nach basischer Chromatographie nur in geringer Konzentration auftritt.

Für Auxin 2 liegen die Rf-Werte von NX 1 zu hoch ("A2" um 0,2). NX 3 sowie die etwas schwächer auftretende, nicht in jedem Experiment vorhandene (Abb. 71) Bande NX 2 dürften ICS bzw. IAAM darstellen. NX 4 ist Rest- oder durch Zusatz verstärkte IES.

Insgesamt auffällig sind die nur geringfügigen Unter-

Front

68



NX 4(IES)

NX 3

NX 2

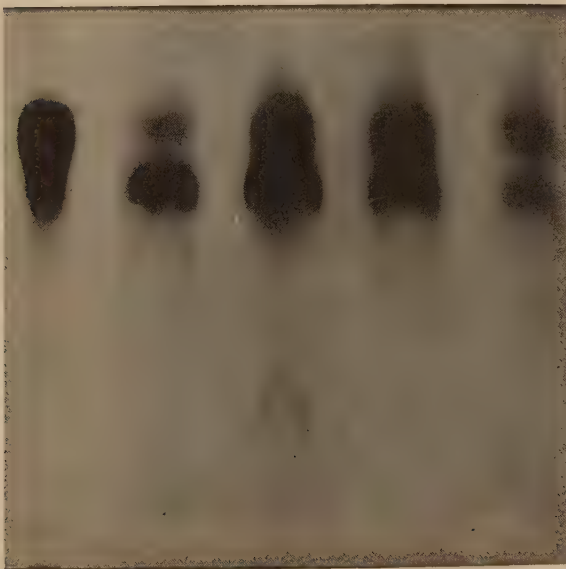
NX 1

Start

IES-2-C¹⁴ 22 8 6 4
Incubation in Stunden

Front

69



NX 4(IES)

NX 3

NX 2

NX 1

Start

IES-2-C¹⁴ 22 8 6 4
Incubation in Stunden

70



IES-2-C¹⁴ 22 8 6 4
Incubation in Stunden

Front

NX 4(IES)

NX 3

NX 2

NX 1

Start

71



IES-2-C¹⁴ 22 8 6 4
Incubation in Stunden

Front

NX 4(IES)

NX 3

NX 1

Start

Abb. 68 und 69

Fütterung von Koleoptilspitzen mit IES-2-C¹⁴.

Autoradiogramme in I/W (10:1) chromatographierter Ätherfraktionen von Wasserdiffusaten.

Ansatz 1 (Abb. 68) mit 0,5 Microcurie zusätzlicher IES-2-C¹⁴, Ansatz 2 ohne zusätzliche IES (Abb. 69).

Abb. 70 und 71

Fütterung von Koleoptilsegmenten mit IES-2-C¹⁴, sonst wie unter 68 und 69.

Ansatz 1 (Abb. 70) mit, Ansatz 2 (Abb. 71) ohne zusätzliche IES-2-C¹⁴.

schiede im Schwärzungsgrad zwischen den verschiedenen Inkubationsstufen. Erwartungsgemäß findet sich mit wachsender Inkubationsdauer zunehmend IAAS (basische Trennung). Auch die Fütterungsversuche mit radio - aktiver IES liefern somit keinen Beweis für eine "A2"-Anreicherung im lebenden Gewebe nach IES-Zusatz.

DISKUSSION

Vor der eigentlichen Besprechung der Resultate sollen einige der wichtigsten Befunde kurz rekapituliert werden. Es wird der Nachweis saurer äther- und wasserlöslicher Auxine im untersuchten Objekt geführt. Die neutrale, nicht hydrolysierte Ätherfraktion von Diffusaten besitzt keine Auxinaktivität.

Die Identifizierung der IES

IES kann in Rohdiffusaten, in der neutral-sauren Ätherfraktion von Wasserdiffusaten, in Agardiffusaten, äthanolischen Extrakten und mit dem Färbungstest zum ersten Mal auch in Ätherextrakten aus Maiskoleoptilen sicher identifiziert werden. Das Auxin läßt sich anhand seiner typischen Färbungsreaktion mit Ehrlich- und Salkowskireagens, seiner Fluoreszenz unter UV-Bestrahlung sowie durch Vergleich der RF-Werte in I/A/W, I/W und der Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld charakterisieren. In I/A/W resultiert ein RF von 0.3-0.4, im neutralen System ein Wert, der zwischen 0.7 und 0.8 schwankt. Die Wanderungsgeschwindigkeit der nativen IES entspricht in gereinigten Ätherfraktionen mit 8-9 cm bei einer Trenndauer von 20 Minuten derjenigen synthetischer IES. In jenen Versuchen, wo die von nativer und synthetischer IES zurückgelegten Strecken differieren, lassen sich als Ursache dieser Effekte störende Begleitsubstanzen ermitteln. Durch spezifische Reinigung (Rückchromatographie etc.) gelingt die Abtrennung der Hemmstoffe und der Beweis, daß Auxin 1 mit IES identisch ist. Mit IES-Gaben, in der Regel 5×10^{-7} g, kann die Aktivität des "A1" bei neutraler und basischer PC sowie der Elektrophorese verstärkt

werden.

SHEN-MILLER und GORDON (1963 und 1966 b) können IES in Wasserdiffusaten der Maiskoleoptile identifizieren und OHWAKI berichtet über ein Vorkommen dieses Auxins in der ätherlöslichen Fraktion von Wasserdiffusaten (OHWAKI 1966).

Die Natur des "A2"

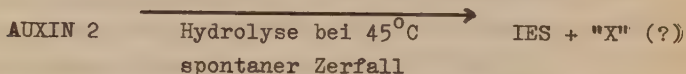
Neben der IES ist mit jeder der verwendeten Methoden ein gebundenes Auxin ("A2") in der Koleoptilspitze nachweisbar. Für diese interessante Substanz errechnet sich in I/A/W ein RF von 0.7-0.9, in I/W ein Wert um 0.2. Während der papierelektrophoretischen Trennung bei pH 5.8 wandert sie praktisch nicht. Dieses Verhalten bei der Trennung charakterisiert Auxin 2 als eine in wässriger Lösung nicht dissoziierende "neutrale" Substanz. Für eine derartige Kategorisierung spricht auch die Umkehrbarkeit des Rf-Wertes, der bei der PC im neutralen System klein (0.2), im basischen aber groß ist.

Dem neutralen Verhalten in den Trennungsgängen steht die Eigenschaft gegenüber, daß Auxin 2 ausschließlich im sauren pH-Bereich mit Äther extrahierbar ist, bei pH 8.0 aber in der Wasserfraktion verbleibt. Das spricht nun wiederum für eine Verbindung mit Säurecharakter. Es dürfte hier also eine Verbindung mit schwach sauren Eigenschaften vorliegen.

Sämtliche Versuche, "A2" als eine Verbindung vom Indoltyp zu klassifizieren, scheiterten, denn die Reaktionen nach Ehrlich oder Salkowski verlaufen farbnegativ.

Die interessanteste Eigenschaft des Auxins, die es gleichzeitig als ein gebundenes Auxin ausweist, besteht in der unter milden Bedingungen erfolgenden

Umwandlung in IES. Der Umwandlungsprozeß läuft auch spontan, d.h. unter nicht kontrollierbaren Bedingungen während der Aufarbeitung des Versuchsmaterials ab; er wird aber durch die Hydrolyse beschleunigt. Der dieser Umwandlung zugrunde liegende Vorgang ist weitgehend unbekannt. Er läßt sich schematisch so formulieren:



Auxin 2 zerfällt in IES und wahrscheinlich eine unbekannte Komponente "X" (sämtliche Versuche, "X" z.B. mit Ninhydrin zu erfassen, mißlingen). Der Zerfall des "A2" in IES ergibt sich 1. aus der Erscheinung, daß dieses Auxin nicht in allen Experimenten auftritt und 2. seine nachweisbare Konzentration in den Einzelversuchen in Abhängigkeit von der IES starken Schwankungen unterworfen ist. In zahlreichen Experimenten findet sich nach der 1. Papierchromatographie entweder viel IES (10^{-6} IES-Grammäquivalente) und wenig "A2" (10^{-8} IES-Grammäquivalente und weniger) oder das Verhältnis liegt umgekehrt. Zwischen beiden Extremen treten alle Übergänge auf (Abb. 16-21, vergl. S. 35-36).

Andererseits ist versucht worden, durch Zugabe synthetischer IES zu Diffusaten (nach Wegnahme der Koleoptilspitzen) das "A2" anzureichern, also die Möglichkeit einer Reaktion gemäß



experimentell zu prüfen.

Von insgesamt sechs durchgeführten Versuchen verlief nur ein Experiment positiv (Abb. 25/1-2 und Seite 46). Hier weist die Zuwachsrates in der "A2"-Position nach Zusatz von 5×10^{-7} g IES eine beträchtliche Steige-

rung (20 %) gegenüber der Kontrolle auf, während im IES-Bereich zwischen beiden Versuchsreihen praktisch keine Unterschiede bestehen.

Die hier diskutierten Untersuchungen über die enge Beziehung zwischen IES und Auxin 2 sind an neutral und basisch getrennten Ätherfraktionen aus Wasserdiffusaten vorgenommen worden. Sämtliche Daten beweisen, daß die Lage des Gleichgewichtes weitgehend zugunsten der IES verschoben sein muß (vergl. S.36). Es bleibt zu klären, zu welchem Zeitpunkt der beobachtete Zerfall von Auxin 2 in IES erfolgt sein kann. Die Diffusionsdauer lag in der Regel zwischen zwei und vier Stunden; die Aufarbeitung selbst, von der Abnahme der Diffusate bis zum Auftragen des Analysengemisches auf das Chromatogramm, erstreckte sich über einen Zeitraum von 30-45 Minuten.

Im Verlauf der Papierchromatographie kann eine wesentliche Freisetzung von IES aus "A2" nicht beobachtet werden. Vielmehr besitzen die zwischen der IES und der "A2"-Position gelegenen Segmente keine oder nur eine sehr geringe Aktivität im Bio-test (Abb. 16-21). Diese Feststellung betrifft basisch und neutral getrennte Chromatogramme gleichermaßen. Eine derartige Umwandlung hätte sich aber infolge einer "Schwanzbildung" bei der PC klar manifestieren müssen. Es ist also anzunehmen, daß bereits vor der chromatographischen Analyse ein Zerfall des "A2" stattgefunden hat. Der Zeitpunkt sowie die Faktoren, die diesen Zerfall kontrollieren, sind nicht bekannt und entziehen sich daher einer Regelung von außen.

Auxin 2 wird ausschließlich mit Hilfe des Avenakoleoptiltests entdeckt, aber es selbst dürfte in

diesem Test nicht aktiv sein. Diese Schlußfolgerung erscheint zunächst unlogisch, ergibt sich aber aus den experimentellen Daten sowie folgenden Überlegungen. In zahlreichen Versuchen ist es nicht möglich, in der "A2"-Position der Chromatogramme das gebundene Auxin mittels Avenakoleoptiltest überhaupt nachzuweisen (Abb. 16-21, S. 36-41). Die Hydrolyse dieser Position im Parallelversuch aber liefert neben geringen "A2"-Resten eindeutig IES. Daraus muß man den Schluß ziehen, daß "A2" im Avenatest nur über eine Sekundäraktivität durch Freisetzung von IES verfügt, selbst aber inaktiv ist. Unterbleibt dieser Zerfall, so ist auch ein Nachweis des "A2" nicht möglich. Er ist in erster Linie von zwei Faktoren abhängig:

1. wieviel "A2" nach der 1. PC zwischen RF 0.7-0.9 noch vorliegt und
2. ob eine Umwandlung Auxin 2 $\rightarrow$ IES im Biotest erfolgt ist oder nicht. Im zweiten Fall kann "A2" noch durch Hydrolyse oder Rückchromatographie erfaßt werden.

In jenen Versuchen, in denen die "A2"-Position nach der 1. Papierchromatographie eluiert und hydrolysiert wird, kann über die IES auch Auxin 2 nachgewiesen werden. Es ist aber praktisch nicht durchführbar, diese Hydrolyse in jedem Einzelversuch vorzunehmen, d.h. daß in den Versuchen, die in der "A2"-Position im Biotest eine Aktivität vermissen lassen, "A2" dennoch vorhanden sein kann.

Die biologischen und chemischen Eigenschaften des "A2" wurden den Daten bekannter Indolderivate und anderer identifizierter und nicht-identifizierter Auxine gegenübergestellt.

Auxin 2 läßt zwar eine typische Indolreaktion mit den spezifischen Nachweisreagenzien vermissen, und

das spricht gegen eine Identität mit einem der bekannten Indolderivate (die Konzentration der IES aber ist für den chemischen Test hoch genug!); andererseits stellt dieses Verhalten kein überzeugendes Gegenargument dar, denn der Nachweis im relativ unempfindlichen chemischen Test (10^{-6} g untere Grenze) erfordert eine relativ hohe Auxinkonzentration.

Neutrale Auxine, wie IAN (Indolacetonitril), IAAl_d (Indolacetaldehyd), Tryptophan und IAAm (Indolacetamid), verbleiben nach JERCHEL und STAAB-MÜLLER (1954) und MELCHIOR (1957) bei der Papierelektrophorese am Startpunkt. Mit diesen Auxinen kann "A2" aber nicht in Beziehung gesetzt werden, weil es (im Gegensatz zu diesen Substanzen) nur bei pH 2.8-2.9 mit Äther extrahiert werden kann. Kefford (1955) sowie CARTWRIGHT, SYKES und WAIN (1956) berichten, daß IAN auch in der sauren Ätherfraktion erscheinen kann. IAN unterscheidet sich von Auxin 2 durch seinen RF-Wert in I/A/W (0.99) und durch sein Verhalten gegenüber den einschlägigen Nachweisreagenzien. IAAm ist aus dem gleichen Grund nicht in Betracht zu ziehen.

Indol-Acetylasparaginsäure und Indol-Acetylglutaminsäure sind zwar über die IES im Biotest aktiv, weichen aber in ihren sonstigen Eigenschaften beträchtlich vom "A2" ab (RF in I/A/W und I/W).

BOOTH hat eine geringe Ätherlöslichkeit einiger Zucker beobachtet, die bei Verwendung wässriger Äthers auch auf Chromatogrammen auftreten können (BOOTH 1958). Für einen Zucker oder einen Zuckerester liegen die RF-Werte des "A2" in I/A/W zu hoch; zudem ist ausschließlich getrockneter Äther für die Auftragung des Analysengemisches verwendet worden.

Nach KLÄMBT sind Zuckerester meist äußerst labil gegenüber ammoniakalischer Behandlung (wobei in der Regel IAAM entsteht), dafür aber relativ hitzebeständig. So übersteht Indol-3-acetyl- β -D-Glucose das Kochen mit 80 %igem Äthanol (KLÄMBT 1961 a). Diese Substanz ist nach ZENK zudem ausschließlich wasserlöslich (ZENK 1961).

Auch zwischen 5-Hydroxytryptophanpeptid und dem unbekannten Auxin ergeben sich keine Parallelen. Die Hydrolyse des Peptids liefert Aminosäuren, 5-OH-Tryptophan und 5-OH-IES (WINTER und STREET 1963). Sein RF in I/A/W (10:1:1) schwankt zwischen 0.8 und 1.0. Das Peptid reagiert positiv mit FeCl_3 - HClO_4 sowie Ninhydrin, und als Hydrolyseprodukte des "A2" fehlen Aminosäuren.

In Extrakten aus Maiskörnern und -wurzeln (BENTLEY, HOUSLEY und BRITTON 1956), Wurzelspitzen von Tomaten (BRITTON, HOUSLEY und BENTLEY 1956), aber auch in Algen (BENTLEY 1963) existieren wasserlösliche "interconvertible auxins" (X, Y und Z), die bei Rückchromatographie in Butanol wechselseitig ineinander überführbar sind. Diese Auxine treten zum Teil auch in der sauren Ätherfraktion auf, aber in keinem Fall kann als Produkt dieser Umwandlungen IES ermittelt werden (BENTLEY 1963).

Auch der "accelerator α " (BENNET-CLARK und KEFFORD 1953), nach BRITTON, HOUSLEY und BENTLEY (1956) ein neutral bis schwach sauer wirkendes Auxin, unterscheidet sich in seinem Verhalten bei der PC eindeutig von "A2" (RF des "accelerator α " in I/A 0.1, "A2" in I/A/W 0.7-0.9).

Der Begriff "zeanins" bezeichnet nach FARRAR auxinähnliche Verbindungen, die mit $\text{FeCl}_3/\text{HClO}_4$ eine

purpurne Färbung geben, durch NH_3 bei basischer PC zerstört werden und dabei eine Rotreaktion, vergleichbar der IES-Färbung mit diesem Reagens, liefern. Auch mit diesem Auxintyp kann "A2" nicht in Verbindung gebracht werden.

Mit den durch Hydrolyse in IES überführbaren gebundenen Auxinen in Erbsenepikotylen (ISHI 1964) ist "A2" gleichfalls nicht identisch, denn diese Substanzen sind zwischen pH 2-9 überhaupt ätherunlöslich.

In Agardiffusaten aus Maiskoleoptilspitzen wurde neben der IES ein unbekanntes Auxin entdeckt, das dem "A2" in den Eigenschaften sehr ähnlich ist (OHWAKI 1966). Bei dünnschichtchromatographischer Trennung mit Methylacetat/Acetonitril/Ammoniak/Wasser liegt der RF dieses Auxins bei 1.0 ("A2" in I/A/W um 0.8). Ein direkter Vergleich der RF-Werte ist nicht möglich, doch beziehen sich beide Werte auf basische Lösungsmittelsysteme.

Die Eigenschaften des "A2" stimmen teilweise mit denen des unbekannten Auxins "P" überein, das in Wasserdiffusaten und Ätherextrakten aus Avena- und Maiskoleoptilen existiert (SHEN-MILLER und GORDON 1963 und 1966 b). "P" liefert diesen Autoren zufolge nach kurzfristiger Behandlung (3 Minuten) bei 97°C IES, geringe Aktivität bleibt in der "P"-Position zurück. Ohne Hitzebehandlung findet keine Umwandlung "P" $\rightarrow$ IES statt, im Gegensatz zu diesen Untersuchungen, wo ein spontaner Zerfall, basierend auf entsprechenden Resultaten (Seite 36-41), angenommen werden muß.

In Übereinstimmung mit den Eigenschaften des "A2" wird für "P" sein ausschließliches Auftreten in der sauren Ätherfraktion und sein Fehlen in der neutralen Ätherfraktion berichtet. "P" besitzt nach

SHEN-MILLER und GORDON keine Wirkung im Avenakrümmungstest, ist aber aktiv im Avenasegmenttest, während hier eine derartige Deutung der Resultate nicht möglich ist, sondern auf Grund der Befunde eine Sekundäraktivität des Auxins ("A2") über eine Freisetzung von IES wahrscheinlicher ist.

In Wasserdiffusaten aus Avenakoleoptilen fanden RAADTS und SÖDING (1957) eine mit dem "A2" in vielen Punkten übereinstimmende Substanz ("2. Wuchsstoff"). Der "2. Wuchsstoff" wird als eine unbeständige, nicht in jedem Experiment nachweisbare, wie "A2" mit Äther aus dem angesäuerten Rohdiffusat extrahierbare Verbindung beschrieben. Er fehlt in den Diffusaten, wenn diese mehrere Stunden aufbewahrt werden. Die Autoren vertreten den Standpunkt, daß er vermutlich während dieser Zeit eine Umwandlung in IES erfährt.

Allerdings unterscheiden sich "A2" und der "2. Wuchsstoff" in einem Punkt: Der Rf dieses Auxins wird für I/A/W (80:5:15) mit 0,25 angegeben ("A2" 0.7-0.9 in I/A/W - 10:1:1).

Gleichfalls in Wasserdiffusaten aus Avenakoleoptilen fand BOHLING (1959) einen "3. Wuchsstoff" mit einem Rf-Wert von 0,75 in I/A/W (80:5:15), der allerdings nicht einwandfrei reproduzierbar war.

Bei der Beurteilung der Frage nach der Natur des "A2" muß nicht zuletzt auch die Frage geprüft werden, ob dieses Auxin nur ein bei der Aufarbeitung entstehendes Kunstprodukt darstellt; denn in den vergangenen Jahren sind zahlreiche auxinähnliche Substanzen nachträglich als Artefakte der Aufarbeitung erkannt worden (ZENK 1965; SHANTZ 1966).

So findet z.B. GUNNING auf mit I/A/W (10:1:1) getrennten Chromatogrammen äthanolischer Pflanzenex-

trakte im Startbereich eine beträchtliche Aktivität im Avenasegmenttest, der ein Artefakt der basischen Chromatographie zugrunde liegt. Dieses Produkt erweist sich als Ammoniumhydrogenmalat; aktive Gruppe im Biotest ist das NH_4^+ (GUNNING 1961 und 1962).

Bei kritischer Betrachtung der Resultate scheidet die Möglichkeit, daß mit "A2" ein Artefakt vorliegt, aus folgenden Gründen aus:

1. kann "A2" generell, d.h. mit jeder der verwendeten Methoden - Extraktion mit Äther oder Äthanol, Diffusion in Agar oder Wasser - erfaßt werden;
2. findet neben dem zur Artefaktbildung neigenden basischen Lösungsmittel die neutrale Chromatographie sowie eine Elektrophorese Verwendung;
3. wird bei der basischen PC synthetischer IES in der "A2"-Position keine Aktivität (Artefaktbildung) gefunden (Abb. 47 und 48) und
4. ist es mit Schwierigkeiten verbunden, das "A2" nach Ablauf von 4-6 Stunden in den Diffusaten überhaupt noch nachzuweisen.

So tritt das Auxin in den zeitabhängigen Diffusionsversuchen nur in den ersten 4-6 Stunden nach Versuchsbeginn auf (Abb. 2 und 3, S. 18-19), während es in den zu einem späteren Zeitpunkt abgenommenen Fraktionen vollständig fehlt. Das kann auf einer Erschöpfung des "A2"-Gehaltes der Koleoptilspitzen beruhen. Es ist aber auch denkbar, daß die Stabilität des "A2" nur durch den intakten Keimling voll gewährleistet ist, und mit der beginnenden Isolierung durch Extraktion oder Diffusion auch der Zerfall dieser Substanz eingeleitet wird. Eine derartige Abhängigkeit von der Dauer der Aufarbeitung ist für ein Artefakt nur sehr schwer vorstellbar.

SHEN -MILLER und GORDON (1966 b) sowie RAADTS und SÖDING (1957) beobachten für ihren Wuchsstoff "P" bzw. den "2. Wuchsstoff" eine ähnliche zeitbedingte Abhängigkeit.

Der Status der IES in der Koleoptile

Bei der Diskussion der Resultate ist besonders die enge Verknüpfung zwischen IES und Auxin 2 deutlich geworden. Es stellt sich daher die Frage, welcher Teil der auf den Chromatogrammen nachweisbaren IES im Untersuchungsobjekt ursprünglich als freie Säure vorgelegen hat oder anders, was davon erst sekundär während der Aufarbeitung gebildet wird; denn letztlich interessieren nur die natürlichen Verhältnisse im untersuchten Objekt.

Wenn, wie in der vorliegenden Arbeit, IES unter sehr milden Bedingungen aus einem gebundenen Auxin entsteht, so muß ein Teil dieser IES als ein bei der Aufarbeitung entstehendes Produkt angesehen werden. Umgekehrt erscheint dann das Auxin 2 erst recht als ein nativ vorkommendes Auxin. Das bedeutet, daß der IES-Gehalt/Koleoptile geringer sein muß (hier etwa 10^{-9} g) als ermittelt.

Die fraktionierte Ausschüttelung angesäuerter Wasserdiffusate mit Äther und die getrennte Untersuchung der einzelnen Ätherfraktionen (Abb. 33 und 34, S. 52-56) beweisen, daß die dreimalige Ätherextraktion die IES praktisch vollständig aus der wässrigen Lösung entfernt. Durch Hydrolyse des neutralisierten Rückstandes bei 60-70° entsteht erneut ätherlösliches aus wasserlöslichem Auxin (Abb. 33 und 34). Bei der Gegenüberstellung der aus der Aktivität der sauren Ätherfraktion und der nach Hydrolyse bei 60-70°C erneut freiwerdenden Aktivität resultierenden GESAMTAKTIVITÄT mit der Wirkung eines direkt geteste-

ten Rohdiffusates (Abb. 31 und 34) fällt ein markanter Unterschied auf. Die Rohdiffusate besitzen eine geringere Aktivität als die saure Ätherfraktion + Hydrolyseprodukte.

Es ist evident, daß aktives Auxin (IES !) aus inaktiven (wasserlöslichen) Vorstufen entstanden ist. Der wasserlösliche Rückstand enthält gewissermaßen ein "AUXIN-RESERVOIR", aus dem auf hydrolytischem Wege aktives Auxin entstehen kann.

Andererseits beweisen die Experimente mit äthanolischer und ätherischer Extraktion (Abb. 39-45), daß in der Koleoptile ein Teil des Auxins als IES vorliegt und direkt extrahiert werden kann.

HAMILTON und Mitarbeiter berichten über ähnliche labile Komplexe in äthanolischen Extrakten aus Maiskörnern (HAMILTON, BANDURSKI und GRIGSBY 1961). Auch nach Ätherextraktion unreifer Maiskörner verfügt der wasserlösliche Rückstand über eine beträchtliche Aktivität (FARRAR, BENTLEY, BRITTON und HOUSLEY 1958).

Die enzymatische Umsetzung von Tryptophan in IES während der Diffusion und der Extraktion ist praktisch ohne Bedeutung für die IES-Ausbeute. So hat Tryptophanzusatz in keinem Fall eine gesteigerte IES-Produktion zur Folge (Abb. 49-52). SRIVASTAVA erzielt ähnliche Resultate in mit Tryptophan inkubierten Maiskörnern, Maiskoleoptilen und Tomatenkeimlingen (SRIVASTAVA 1964). SRIVASTAVA vertritt auf Grund der Befunde den Standpunkt, daß die Maiskoleoptile keine IES aus Tryptophan synthetisieren kann.

Eingehenderes Interesse verdienen die Arbeiten von SHEN-MILLER und GORDON, da sie sich mit dem gleichen Objekt (bei unterschiedlicher Problemstellung) befassen (SHEN-MILLER und GORDON 1963, 1966 a und b).

Sie berichten über nicht weniger als vier äther-lösliche Auxine in der sauren Ätherfraktion von Was-serdiffusaten und Ätherextrakten aus Mais- und Avena-koleoptilen. In der Arbeit von 1963 wird lediglich die Existenz zweier Auxine erwähnt (SHEN-MILLER und GORDON 1963).

Die neueren Befunde von SHEN-MILLER und GORDON (1966 b) weichen in einigen Punkten beträchtlich von Berichten verschiedener Autoren und den hier dargestellten Resultaten ab (SHIBAOKA und YAMAKI 1959, RAADTS und SÖDING 1957, OHWAKI 1966).

Bei ausschließlicher Verwendung einer basischen PC (I/A/W = 10:1:1) wird von SHEN-MILLER und GORDON im wesentlichen folgendes gefunden:

Die größte Aktivität tritt im IES-Bereich (RF 0.35) und in der "P"-Position (RF 0.65) auf. Ein drittes Auxin ("F") nahe der Lösungsmittelfront und ein viertes mit einem RF-Wert von 0.43 ("M") besitzen nur eine unbedeutende Aktivität im Biotest. "M" findet sich ausschließlich nach Ätherextraktion. "F" tritt auch nicht in jedem Experiment auf, sondern nur, wenn die Objekte 1 Stunde vor der Präparation mit Rotlicht behandelt werden. "P" und "F" sind gleichfalls nur innerhalb einer begrenzten Zeit nachweisbar.

Wenn ein Zeitraum von 2¹/₂ Stunden zwischen der Präparation der Koleoptilspitzen und der Isolierung des Auxins liegt, ist ausschließlich IES, aber weder "P" noch "F" vorhanden. Bei mit Blaulicht bestrahlten Pflanzen verschiebt sich das Verhältnis IES/P+F zugunsten der IES, der Gesamtauxingehalt aber bleibt konstant.

Beim Vergleich dieser Ergebnisse mit den vorliegenden Resultaten werden Parallelen, aber auch Unterschiede deutlich. IES und "A2" bzw. "P" werden übereinstimmend in beiden Arbeiten gefunden.

"F" identifizieren SHEN-MILLER und GORDON einzig nach Rotlichtbehandlung der Objekte unmittelbar vor der Präparation. Eine Rotlichtbestrahlung der Versuchspflanzen zur Unterdrückung des Mesokotylwachstums erfolgt in diesen Untersuchungen zu einem wesentlich früheren Zeitpunkt, 48 Stunden nach der Aussaat bzw. 24 Stunden vor der Präparation.

Auf mit I/A/W getrennten Papieren wird nahe der Lösungsmittelfront meist eine leichte Hemmung im Biotest erhalten (entspricht der "F"-Position), die auf geringen Verunreinigungen des Papiers beruht. Auch auf vorbehandelten Papieren treten nie mehr als zwei Auxine auf. Die Aktivität von "M", von SHEN-MILLER und GORDON ausschließlich in Ätherextrakten gefunden, wird von den Autoren als sehr gering bezeichnet. "M" besitzt in I/A/W einen RF von 0.4-0.5. Auch in meinen Versuchen tritt in dieser Position gelegentlich eine geringe Aktivität auf (Abb. 15/2, 20/2, 21/1-2). Das wurde aber in keinem Fall mit der Wirkung eines dritten Auxins in Verbindung gebracht, sondern dürfte eher einer geringen Verschleppung von IES oder Auxin 2 (vielleicht auch einer geringen Umwandlung "A2" → IES) zuzuschreiben sein.

An dieser Stelle sei an die Verschleppung der nativen IES durch Hemmstoffe bei der elektrophoretischen Trennung (Abb. 2 und 3) erinnert, wo die IES über 4-5 cm verteilt wird. Dieser störende Effekt kann durch weitgehende Reinigung oder durch Halbierung der Fraktionen vermieden werden. Bei einer Überlagerung durch Hemmstoffe oder andere Begleitsubstanzen ist es sehr leicht möglich, daß ein über mehrere Zentimeter verteilter Aktivitätsbereich eines Auxins optisch die Existenz zweier Auxine vortäuscht. Es soll hier keineswegs eine derartige Möglichkeit für die Versuche

SHEN-MILLERS und GORDONS postuliert werden, doch darf andererseits nicht übersehen werden, daß hier mit verschiedenen Methoden nur die Isolierung zweier Auxine sicher gelingt.

In Lichtpflänzchen findet sich bedeutend weniger Auxin als in Dunkelobjekten. Für die IES ergibt sich ein Verhältnis von etwa 1:10 (Abb. 28-30), ablesbar durch Vergleich mit der entsprechenden IES-Kontrolle. Im Gegensatz dazu erzielen SHEN-MILLER und GORDON eine durch kurze Rotlichtbehandlung (20 sec) gesteigerte Umwandlung F+P $\rightarrow$ IES. Diese unterschiedlichen Resultate können nicht miteinander verglichen werden, denn in der vorliegenden Untersuchung werden unter Licht gewachsene, grüne Pflanzen am Ende einer zwölfstündigen Lichtperiode (2000 Lux) geschnitten, während die zitierten Autoren die Versuchspflanzen lediglich einem phototropischen Reiz von kurzer Dauer (20 sec) aussetzen.

Im Gegensatz zu SHEN-MILLER und GORDON (1966 b) wird von SHIBAOKA und YAMAKI (1959) IES nur in Agardiffusaten aus der Avenakoleoptile identifiziert. Auch SCOTT und JAKOBS (1962) finden mit einer Agarabfangmethode in *Coleus blumei* nur IES, bei Extraktion mit Äther aber noch weitere Auxine. Sie plädieren daher für die Methode der Agardiffusion.

In Agardiffusaten aus Maiskoleoptilen weist OHWAKI nur zwei Auxine (IES und einen 2. Wuchsstoff) nach (OHWAKI 1966).

Diskussion der Inkubationsversuche

Die Zielsetzung in den Inkubationsversuchen bestand darin, durch IES-Gaben das "A2" im lebenden Gewebe möglichst anzureichern.

Die Fütterung nicht-markierter IES an Koleoptilspitzen und -segmente liefert IAAS, ICS und IAAM als Umbau - produkte, wobei sich eine strenge Abhängigkeit von der Konzentration des Inkubationsmediums ergibt. Nur in der höchsten Anfangskonzentration (10^{-4} g/ml IES) können IES, IAAS, ICS und IAAM sicher identifiziert werden. Mit abnehmender Konzentration treten schrittweise weniger (10^{-5} g/ml IES) oder gar keine Umwandlungsprodukte mehr auf (10^{-6} g/ml IES).

Als Hauptprodukt der IES-Umwandlungen tritt IAAS auf. Nach vierstündiger Inkubation ist sie in Stufe 1 (10^{-4} g/ml IES), nach der langen Periode auch in Stufe 2 (10^{-5} g/ml IES) im Gewebe nachweisbar. Infolge der Überlagerung durch Phenole am Ausgangspunkt gelingt ihre Identifizierung auf basisch getrennten Chromatogrammen nicht, dafür aber anhand der violetten Farbreaktion mit Salkowskireagens und des RF-Wertes (0.37-0.39) auf neutral getrennten Papieren.

Umgekehrt können IAAM, ICS und IES auf neutralen Chromatogrammen nur schwer identifiziert werden. Bei diesen Versuchen zeigt sich die gute wechselseitige Ergänzung beider Trennmethoden besonders deutlich. In zahlreichen Arbeiten wird über die IAAS als das Hauptprodukt ähnlicher Fütterungsversuche berichtet. In Erbsenepikotylen und -wurzeln, Maiskoleoptilen, Weizenkeimlingen und anderen Objekten entsteht IAAS als Konjugationsprodukt der IES und der Asparaginsäure (ANDREAE und GOOD 1955; GOOD, ANDREAE und VAN YSSELSTEIN 1961; ANDREAE, ROBINSON und VAN YSSELSTEIN 1961; KLÄMBT 1961 a; DEVERALL und DALY 1964).

Sicher identifiziert werden kann auch die ICS (orange mit $\text{FeCl}_3/\text{HClO}_4$, RF in I/A/W 0,25, in I/W 0,69), die ausschließlich nach Fütterung mit 10^{-4} g/ml IES auftritt (Abb. 53-57). Ihr RF wird in der Literatur mit 0.24

(MÜLLER 1961) bzw. 0,22 (SEN und LEOPOLD 1954) angegeben. SRIVASTAVA und SHAW (1962) finden in Weizenblättern ICS nach Fütterung mit IES-1-C¹⁴. Von SEELY und Mitarbeitern wird die Ansicht vertreten, daß ICS nur in Verbindung mit lebendem Gewebe entstehen kann (SEELY, FAWCETT, WAIN und WIGHTMANN 1956).

Mehrere Autoren berichten über eine ICS-Bildung aus IAN (LIBBERT 1961; THURMANN und STREET 1962; SCHIEWER und LIBBERT 1963), aus dem es durch α -Oxidation entstehen soll (FAWCETT 1961). Als nativ vorkommendes Auxin wurde ICS seltener isoliert. MÜLLER berichtet über einen derartigen Befund in Blumenkohlextrakten (MÜLLER 1961). In mehreren biologischen Tests, u.a. einem Weizenzyindertest, ist ICS inaktiv (FAWCETT, WAIN und WIGHTMANN 1961). Auch diese Autoren halten die ICS für ein Abbauprodukt des IAN (in den Fütterungsversuchen der vorliegenden Arbeit wurde nur die saure Ätherfraktion geprüft; möglicherweise blieb das neutrale IAN in der wässrigen Fraktion zurück).

Die Identifizierung des IAAM ist schwieriger, da dieses Auxin wie IES mit Salkowskireagens rosa angefärbt wird. Es kann in erster Linie anhand seines RF-Wertes in I/A/W (in I/W erfolgt wieder Überlagerung durch Phenole) und seiner charakteristischen Aktivität im Biotest durch Vergleich mit der Wirkung synthetischer Substanz unterschiedlicher Konzentration ermittelt werden (Abb. 60). Typisch für dieses Auxin ist die geringe Aktivität relativ hochkonzentrierter Lösungen in verschiedenen Biotests, die wahrscheinlich auf einer nur geringen Umwandlung in IES beruht. Konzentrationen von 10^{-8} und 10^{-7} g/ml IAAM sind im Avenatest nur schwach aktiv, erst 10^{-6} g/ml sind wirksamer (Abb. 60). Ein mit diesem nahezu identisches Aktivitätsspektrum im Krümmungstest und dem Weizen-

koleoptilzylindertest wird von SEELY und Mitarbeitern angegeben (SEELY, FAWCETT, WAIN und WIGHTMANN 1956). In Wasser gelöstes synthetisches IAAM läßt sich ohne Schwierigkeiten bei pH 2.8 mit Äther extrahieren.

Dabei entsteht hydrolytisch geringfügig IES. Als neutrales Auxin kann IAAM also auch in der sauren Ätherfraktion erscheinen. MAGIE, WILSON und KOSUGE (1963) extrahierten IAAM bei pH 3 gleichfalls mit Äther, während SRIVASTAVA und SHAW (1962) erstaunlicherweise das mit synthetischer Substanz nicht gelang.

Über ein natürliches Vorkommen des Indolacetamids ist bisher nichts mit Sicherheit bekannt (FAWCETT 1961), obgleich IAAM neuerdings wieder als ein Zwischenprodukt bei der Umwandlung des Tryptophans zu IES angesehen wird, aus dem es durch oxidative Decarboxylierung gebildet werden soll (DANNENBURG und LIVERMANN 1957; MAGIE, WILSON und KOSUGE 1963; RIDDLE und MAZELIS 1965). Diese Resultate beziehen sich ausschließlich auf Fütterungsversuche.

Zahlreiche Befunde sprechen auch dafür, daß IAAM ein bei der Präparation entstehendes Artefakt darstellt. Es wird teilweise nur bei überoptimalen IES-Gaben zusammen mit 2-OH-IAAM gefunden (KLÄMBT 1961 a).

ZENK berichtet, daß Indolacetyl- β -D-Glucose gegenüber NH_3 äußerst anfällig ist und sehr leicht in IAAM überführt wird (ZENK 1961), und auch JEPSON spricht dieses Auxin als ein künstliches Produkt an, das in Gegenwart von Ammoniak aus verschiedenen Estern gebildet werden soll (JEPSON 1958).

Andererseits betrachten GOOD und Mitarbeiter IAAM als ein hauptsächlich bei der Inkubation der Gräserkoleoptile (u.a. auch der Maiskoleoptile) entstehendes Produkt des IES-Umbaues (GOOD, ANDREAE und VAN YSSELSTEIN 1956). Den Resultaten dieser Arbeit zufolge stellt IAAM ein chromatographisches Artefakt dar. Für eine derartige

Interpretation sprechen folgende Punkte:

1. wird IAAm nur nach Fütterung mit überoptimalen IES-Konzentrationen gefunden,
2. ist das Auxin ausschließlich auf basisch getrennten Papieren nachweisbar und
3. bildet IAAm bei der PC "Schwänze" (Abb. 53 und 59); das spricht für eine Umsetzung während der Trennung.

Die Strecke zwischen der IES und dem Indolacetamid IES 0.3-0.4, IAAm 0.67-0.69) erscheint nach Besprühen mit Salkowskireagens schwach rosa gefärbt ("Schwanzbildung"). Der Chromatogrammbereich 0,6-0,8 liefert nach Hydrolyse aber nur eine geringe Aktivität. Intensität und Ausdehnung der angefärbten Fläche entsprechen etwa der Konzentration von 10^{-6} g IES/cm² (Abb. 53 und 58). IES würde bei einer derart hohen Konzentration im Avenakoleoptiltest eine bedeutend größere Wachstumsförderung auslösen; daher kann keine IES vorliegen (vgl.S. 86).

Über die IES-Verluste der Ausgangslösung und die Akkumulierung durch lebendes Gewebe liegen ausführliche Untersuchungen vor (ANDREAE, GOOD und VAN YSSELSTEIN 1956; ANDREAE und VAN YSSELSTEIN 1960 a und b). In diesen Experimenten wird eine starke Abhängigkeit der IES-Verluste von der Anfangskonzentration gezeigt; mit steigender Konzentration der Basallösung wächst auch die Verlustrate.

In den Fütterungsversuchen wird ähnliches beobachtet. Nach vierstündiger Inkubationsdauer sind im Fall der höchsten Anfangskonzentration (10^{-4} g/ml IES) 20-30 % der IES aus dem Basalmedium verschwunden, nach 20 Stunden ist dieser Wert auf 90 % gestiegen. Nur ein kleiner Teil kann davon im Gewebe als IES wiederent-

deckt werden (12-18 % der "verschwundenen" IES oder 3-3,5 % der "GESAMT-IES"). Diesen quantitativen Überlegungen sind durch die Empfindlichkeit der Reaktion nach GORDON und WEBER Grenzen gesetzt.

Aufschlußreicher sind daher die Versuche mit radioaktiver IES. Das verwendete Präparat besaß eine spezifische Aktivität von 216 Microcurie/mg. Bei Zuführung von 1 μc /Versuch ergab sich eine IES-Konzentration von $4,6 \times 10^{-6} \text{ g/2 ml}$ oder $2,3 \times 10^{-6} \text{ g/ml}$, also bedeutend weniger als bei Verwendung nicht-markierter IES.

Trotz der geringen Anfangskonzentration der Basallösung ist zu jedem Zeitpunkt (4, 6, 8 und 22 Std) im Gewebe IES vorhanden (Abb. 63-66, 68-71). Im Gegensatz zu den Experimenten mit nicht-markierter IES, wo ICS und IAAm ausschließlich in Stufe 1 (10^{-4} g/ml IES-Ausgangskonzentration) auftreten, sind diese Substanzen bei Fütterung mit IES-2-C¹⁴ ($2,3 \times 10^{-6} \text{ g/ml}$) auch vorhanden. Das Ganze scheint also lediglich eine Frage der Empfindlichkeit des Nachweises zu sein.

Auf den Autoradiogrammen können nach basischer PC IAAS (BX 1), ICS (BX 2), IES (BX 3) und IAAm (BX 4), auf neutralen Papieren IES (NX 4), ICS (NX 3) und IAAm (NX 2) identifiziert werden (Abb. 63-66 und 68-71). NX 1 korrespondiert mit IAAS (0,22-0,36). Bei neutraler Chromatographie neigt es geringfügig zu Schwanzbildung und wird durch zusätzliche IES-Gaben als einzige Komponente (neben der IES) verstärkt. Nach 22-stündiger Inkubation ist in dieser Position am wenigsten Aktivität vorhanden (Abb. 68-71). Das alles spricht gegen eine Identität mit IAAS, die mit zunehmender Versuchsdauer angereichert werden sollte. Auch besitzt das Konjugat eine energiereiche Säureamidbindung, deren Bildung wahrschein-

lich über das Coenzym A läuft (KLÄMBT 1961 a), und es ist schwerlich denkbar, daß eine derartige Verknüpfung nach Zugabe von IES in Ätherextrakten ablaufen kann. Vielmehr dürfte NX 1 aus zwei Komponenten bestehen, einem geringen IAAS-Anteil und einer zweiten Substanz (?). Die IAAS-Bande basisch getrennter Papiere ist nur schwach ausgeprägt, und nur der Umstand, daß die IAAS in der Nähe des Startpunktes verbleibt, also auf einen engen Raum zusammenrückt, dürfte ihre Identifizierung überhaupt ermöglichen.

Der RF für NX 2 deckt sich mit dem für IAAM ermittelten Wert (Abb. 68-71). Bei neutraler Chromatographie ist diese Bande (in Abwesenheit von NH_3 !) nur schwach entwickelt. In I/A/W wird BX 4 (IAAM) durch zusätzliche IES-2-C¹⁴ eindeutig verstärkt (Abb. 63-66); daher stellt IAAM mit Sicherheit wenigstens teilweise ein Artefakt der basischen PC dar.

Das verwendete Präparat besitzt den Nachteil, daß in I/A/W ein Zerfall in drei Komponenten - IES, BX 4 (IAAM) und BX 5 (?) - erfolgt. Reinigung durch Elution und Rückchromatographie in I/A/W verbessert die Situation nicht wesentlich. Die zur Verfügung stehende IES besitzt im Vergleich zu dem beispielsweise von KLÄMBT (1961 a) verwendeten Präparat eine hohe Aktivität (37.8 mc/mMol gegenüber 3.82 mc/mMol). Sicher begünstigt diese hohe Aktivität den Zerfall der IES.

Die Methylgruppe der IES wird bei Abbauprozessen erst relativ spät angegriffen. Quantitative Untersuchungen über dieses Problem liegen von ANDREAE, ROBINSON und VAN YSSELSTEIN (1961) sowie von FANG, THEISEN und BUTTS (1959) vor. ANDREAE und Mitarbeiter verwenden IES-1-C¹⁴ (Carboxylgruppe markiert), IES-2-C¹⁴ (methylenmarkiert) und IES-7a-C¹⁴ (kernmarkiert). Im

Verlauf einer 24-stündigen Fütterungsperiode ergeben 0,2 % der IES-7a-C¹⁴, 0,7 % der IES-2-C¹⁴ und 19,1 % der IES-1-C¹⁴ auf respiratorischem Wege C¹⁴O₂.

IES-1-C¹⁴ erscheint denkbar ungeeignet für Inkubationsversuche, während die beiden anderen Präparate nahezu gleichwertig sind.

Bei der Chromatographie der IES-2-C¹⁴ bleibt am Startpunkt ein Artefakt zurück (ANDREAE, ROBINSON und VAN YSSELSTEIN 1961), das hier auch in Erscheinung tritt (Abb. 63-66).

Anreicherung des "A2"

Weder die Zufuhr markierter noch die normaler IES hat eine Anreicherung des "A2" zur Folge. Die Hydrolyse der "A2"-Position basisch getrennter Chromatogramme bei 45° nach Fütterung mit nicht-markierter IES liefert keinen sicheren Anhaltspunkt in dieser Richtung. Mit IES-2-C¹⁴ kommt es zu der schon erwähnten Artefaktbildung in der "A2"-Position (BX 5), während in I/W der "A2"-Bereich keine Verstärkung (der Wert für NX 1 liegt zu hoch) erkennen läßt.

Zusammenfassend kann festgestellt werden: Die Anreicherung von "A2" durch Fütterung von Koleoptilspitzen oder -segmenten gelingt nicht. Das verstärkt den Eindruck, daß nur in Verbindung mit der intakten Koleoptile die Stabilität des "A2" voll gewährleistet sein dürfte.

Die Hemmstoffe der Maiskoleoptile

Es muß nicht erst auf die Rolle der Hemmstoffe hingewiesen werden; sie wird auch so deutlich. Die gelben Pigmente der Maiskoleoptile zeichnen mit Sicherheit für das Scheitern vieler Experimente und für die Schwierigkeiten, die sich der Identifizierung der IES in diesem Objekt entgegenstellten, verantwortlich.

Das bezieht sich in erster Linie auf Ätherextrakte. Damit ist bereits eine Eigenschaft dieser Pigmente besonders hervorgehoben: Sie sind in Äther außerordentlich gut löslich.

In I/A/W (10:1:1) resultiert für die Hemmstoffe ein RF zwischen 0 und 0.2 (IES 0.3-0.4, "A2" 0.7-0.8), in I/W (10:1) ein Wert von 0.6-0.8 (IES 0.7-0.8, "A2" um 0,2). Nach chromatographischer Trennung von Ätherextrakten kommt es im Hemmstoffbereich zu einer totalen Wachstums~~hemmung~~ im Biotest, und da in I/W eine Überlagerung zwischen IES und den Phenolen stattfindet, ist der direkte Nachweis des Auxins durch neutrale Chromatographie nicht gegeben. Erst nach papierelektrophoretischer Vorreinigung der Ätherextrakte, in der die Hemmstoffe infolge ihres schwachen Säurecharakters am Ausgangspunkt liegenbleiben, gelingt der Nachweis auch auf neutralen Papieren (Abb. 45/1-2).

Die schwärzliche Verfärbung der gelben Pigmente, die kurz nach dem Einhängen der Papiere in die Tröge bei Gegenwart von Ammoniak zustande kommt, deutet auf Phenole hin. Nach Rückchromatographie in B/E/W geben zwei Komponenten mit verschiedenen Nachweisreagenzien Phenolreaktionen (Paulyreagens, Roux'-R., FeCl_3 , ammoniakalisches Silbernitrat und p-Nitranilin). Eine weitere Differenzierung der Hemmstoffe anhand der RF-Werte ist nicht möglich.

Mit dem β -Inhibitorkomplex, der in I/A/W einen RF von 0.50-0.85 aufweist (BENNET-CLARK und KEFFORD 1953; LANE und BAILEY 1965), sind sie nicht identisch. BOHLING (1959) sowie SHEN-MILLER und GORDON (1966 b) finden gleichfalls einen Hemmstoff, der in I/A/W am Startpunkt zurückbleibt. Das Segment nahe der Lösungsmittelfront besitzt in der Regel gleichfalls eine

schwach hemmende Wirkung im Biotest, die von Verunreinigungen des Papierses her stammt und auch in BOHLING's Versuchen auftritt.

Die Wirkung zahlreicher Phenole bei Auxinnachweisen beschränkt sich nicht auf den wachstumshemmenden Einfluß im Biotest, sondern es sind noch andere Effekte bekannt. Phenole können die Salkowskireaktion direkt hemmen (SIEGEL und WEINTRAUB 1952, PLATT und THIMANN 1956), aber auch selbst mit $\text{FeCl}_3/\text{HClO}_4$ eine Farbreaktion geben. So reagiert Katechol braunrosa, Resorcin karminrot und α -Naphthol blau (STOWE, THIMANN und KEFFORD 1956). Auch die Reaktion mit p-Dimethylaminobenzaldehyd/HCl ist nicht für Indolderivate spezifisch, sondern wird von Phloroglucin, Resorcin und Orcin gegeben (STEELINK 1959). Schließlich fördern einige Phenole die Decarboxylierung der IES, während andere diesen Prozeß hemmen (ZENK und MÜLLER 1963).

Von diesen spezifischen Phenolwirkungen wird besonders eine wachstumshemmende Wirkung im Biotest sowie eine Beeinträchtigung oder Verhinderung der Salkowskireaktion auf neutral getrennten Papieren in der vorliegenden Arbeit registriert.

Zusammenfassung

Das Auxin etiolierter Maiscoleoptilspitzen wird qualitativ und quantitativ analysiert. Wasserdiffusate, Agardiffusate, Äther- und Alkoholextrakte aus Coleoptilspitzen dieses Objektes enthalten zwei ätherlösliche Auxine. Lichtpflanzen besitzen erheblich weniger ätherlösliches Auxin als Dunkelobjekte. Das Verhältnis beträgt etwa 1:10 !

1. IES kann definitiv anhand der Rf-Werte in I/A/W (0.3-0.4) und in I/W (0.7-0.8) bei der Papierchromatographie, der Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld, der Aktivität im Avenakoleoptiltest, ihrer Reaktionen mit Salkowski- und Ehrlichreagens und der Fluoreszenz unter UV-Licht identifiziert werden.

2. Mit Auxin 2 ("A2") liegt ein gebundenes Auxin vor, das unter milden Bedingungen hydrolytisch in IES überführbar ist. Die Umwandlung erfolgt teilweise bereits im Verlauf der Präparation und des Trennungsganges der Extrakte und Diffusate. Sein Verhalten in den Ausschüttelungsversuchen (ätherlöslich bei pH 2.8, wasserlöslich bei pH 8.0), in der Papierchromatographie sowie der Elektrophorese charakterisieren es als eine schwach saure Verbindung (RF in I/W um 0.2, in I/A/W 0.7-0.9; bei der Elektrophorese verbleibt es am Startpunkt). Mit den Reagenzien auf Indolderivate sowie Ninhydrin gibt "A2" keine Reaktionen.

3. Die nach Abtrennung der ätherlöslichen Wuchsstoffe verbleibende Wasserfraktion besitzt noch eine potentielle Auxinaktivität. Nach Neutralisation dieser Fraktion kann durch Erhitzen auf 60-70°C inaktives (wasserlösliches) in aktives (ätherlösliches) Auxin umgewandelt werden.

4. Eine Anreicherung von "A2" im lebenden Gewebe durch Fütterung mit radioaktiver (IES-2-C¹⁴) und nicht-markierter IES an Koleoptilspitzen und -segmente ist nicht möglich. Als Reaktionsprodukte der IES treten IAAS, IAAM, ICS, aber kein "A2" auf. IAAM sowie zwei unbekannte Produkte NX 1 (in I/W) und BX 5 (in I/A/W) sind teilweise Artefakte der Chromatographie.

5. Maiskoleoptilen verfügen über beträchtliche Mengen saurer Inhibitoren vom Phenoltyp. Die Hemmstoffe zeichnen für Schwierigkeiten bei der Identifizierung der Auxine verantwortlich, indem sie im biologischen Test und bei Färbungsreaktionen die Auxine überlagern. Infolge ihrer guten Äther-löslichkeit treten sie vorwiegend in den Extrakten in Erscheinung, weniger in den Diffusaten; hier aber, bei fraktionierter Abnahme in bestimmten Zeitabständen, wiederum in der 1. Fraktion. Diese Erscheinung wird einem Wundeffekt zugeschrieben.

Mit Hilfe spezifischer Reaktionen kann für zwei Hemmstoffe der Phenolcharakter nachgewiesen werden. Mit einer Kombination aus neutraler Chromatographie und Hochspannungselektrophorese gelingt die Abtrennung der Hemmstoffe von den Auxinen. Auf basisch getrennten Chromatogrammen kommt es nicht zu einer Überlagerung beider Komponenten.

6. Die Resultate werden diskutiert. Anhand der Versuchsergebnisse wird dargelegt, daß ein Teil der IES während der Präparation aus gebundenem Auxin entsteht und nur die mit Äther oder Äthanol direkt extrahierbare IES als nativ in der Koleoptilspitze vorkommend angesehen werden kann. Weiter wird gezeigt, daß mit Auxin 2 ein zweites natives Auxin

vorliegt, dessen Stabilität offenbar nur in Verbindung mit der intakten Koleoptile voll gewährleistet ist.

LITERATURVERZEICHNIS

- ANDREAE, W.A. and N.E. GOOD: The formation of indole-acetylaspatic acid in pea seedlings. Plant Physiol. 30, 380-83 (1955).
- ANDREAE, W.A., N.E. GOOD and M.W.H. VAN YSSELSTEIN: Studies on 3-indoleacetic acid metabolism. III. The uptake of IAA by pea epicotyls and its conversion to 3-indoleacetylaspatic acid. Plant Physiol. 31, 235-40 (1956).
- ANDREAE, W.A. and N.E. GOOD: Studies on 3-indoleacetic acid metabolism. IV. Conjugation with aspartic acid and ammonia as processes in the metabolism of carboxylic acids. Plant Physiol. 32, 566-72 (1957).
- ANDREAE, W.A. and M.W.H. YSSELSTEIN: The effect of calcium ions on the 3-indoleacetic acid uptake and metabolism by pea roots. Plant Physiol. 35, 220-24 (1960 a).
- ANDREAE, W.A. and M.W.H. VAN YSSELSTEIN: Studies on 3-indoleacetic acid metabolism VI. Indoleacetic acid uptake and metabolism by pea roots and epicotyls. Plant Physiol. 35, 225 (1960 b).
- ANDREAE, W.A., J.R. ROBINSON, M.W.H. VAN YSSELSTEIN: Studies on 3-indoleacetic acid metabolism VII. Metabolism of radioactive 3-indoleacetic acid by pea roots. Plant Physiol. 36, 783-87 (1961).
- AUDUS, C.J. and B.E.S. GUNNING: Growth Substances in the Roots of *Pisum sativum*. Physiol. Plant. 11, 685-97 (1958).

- BATE-SMITH, E.C. and R.G. WESTALL: CHROMATOGRAPHIC BEHAVIOUR AND CHEMICAL STRUCTURE.I. SOME NATURALLY OCCURRING PHENOLIC SUBSTANCES. *Biochimica et Biophysica Acta* 4, 427 (1950).
- BENNET-CLARK, T.A. and N.P. KEFFORD: CHROMATOGRAPHIE OF THE GROWTH SUBSTANCES IN PLANT EXTRACTS. *Nature* 171, 645 (1953).
- BENNET-CLARK, T.A. and A.W. WHEELER: The metabolism of 3-indoleacetic acid in plant tissues. *J. exp. Bot.* 10, 468-79 (1959).
- BENTLEY, J.A., FARRAR, K.R., HOUSLEY, S., SMITH, G.F. and W.C. TAYLOR: Some Chemical and Physiological Properties of 3-Indolepyruvic Acid. *Biochem. J.* 64, 44 (1956).
- BENTLEY, J.A., HOUSLEY, S. and G. BRITTON: HORMONES AND HORMONE PRECURSORS IN LEAVES, ROOTS AND SEEDS.
In: *The Chemistry and Mode of Action of Plant Growth Substances*, 40 (London 1956).
- BENTLEY, J.A.: Some investigations on interconvertible naturally occurring auxins.
In: *Plant Growth Regulation*, 25 (1963).
- BERGER, J. and C.S. AVERY: Isolation of an auxin precursor and an auxin from maize. *Am. Journal of Bot.* 31, 199-203 (1944).
- BOHLING, H: Papierchromatographische Untersuchungen über die Wuchs- und Hemmstoffe des Haferkeimlings und des Maisscutellums. *Planta* 53, 69-108 (1959).

- BOOTH, A: Non-hormonal Growth Promotion Shown by
Aqueous Extracts.
J.exp. Bot. 9, 306 (1958).
- BRIGGS, W.R. and P.M. RAY: AN auxin inactivation system
involving tyrosinase.
Plant Physiol. 31, 165-67 (1956).
- BRITTON, G., HOUSLEY, S. and J.A. BENTLEY: CHROMATOGRAPHIE
OF HORMONES IN EXCISED AND INTACT ROOTS
OF TOMATO SEEDLINGS.
J. exp. Bot. 7, 239 (1956).
- CARTWRIGHT, P.M., SYKES, J.T. and R.L. WAIN: In: The
Chemistry and Mode of Action of Plant
Growth Substances, p. 32, London (1956).
- DANNENBURG, W.N. and J.L. LIVERMANN: Conversion of
tryptophane-2-C¹⁴ to IAA by water-
melon tissue slice.
Plant Physiol. 32, 263-69 (1957).
- von DENFFER, D., M. BEHRENS und A. FISCHER: Papierelek-
trophoretische Trennung von Indolderi-
vaten aus Pflanzenextrakten.
Naturwiss. 39, 258-59 (1952).
- DEVERALL, B.J. and J.M. DALY: METABOLISM OF INDOLEACETIC ACID
IN RUST DISEASES. II. Metabolites of
Carboxyl-labeled Indoleacetic Acid in
Tissues.
Plant Physiol. 39, 1-9 (1964).
- FANG, S.C., P. THEISEN and J.S. BUTTS: Metabolic studies
of applied indoleacetic acid-1-C¹⁴ in
plant tissues as affected by light
and 2,4-D treatment.
Plant Physiol. 34, 26-32 (1959).

- FARRAR, K.R., BENTLEY, J.A., G. BRITTON and S. HOUSLEY:
Auxins in Immature Maize Kernels.
Nature 181, 553-554 (1958).
- FARRAR, K.R.: The zeatinins: A group of Growth-Promoting
Compounds from Immature Maize Kernels.
Biochem. J. 83, 220-224 (1962).
- FAWCETT, C.H.: Indole Auxins.
Ann. Rev. Plant Physiol. 12, 345-368
(1961).
- FAWCETT, C.H., WAIN, R.L., WIGHTMAN, F.: Chromatographic
investigations on the metabolism of
certain indole acids and their amides,
nitriles and methylesters in wheat and
pea tissues.
In: Plant growth regulation, 71-94 (1961).
- FUKUI, N.H., De VRIES, J.E., S.H. WITTEW and H.M. SELL:
Ethyle-3-Indoleacetat: An Artefact in
Extracts of Immature Corn Kernels.
Nature 180, 1205 (1957).
- GOOD, N.E.: The synthesis of indole-3-acetyl-D,L-aspar-
tic acid and related compounds.
Canadian Jour. Chem. 34, 1356-58 (1958).
- GOOD, N.E., W.A. ANDREAE and M.W.H. VAN YSSELSTEIN:
Studies on 3-Indoleacetic Acid Metabo-
lism. II. Some Products of the Metabo-
lism of Exogenous IAA in Plant Tissues.
Plant Physiol. 31, 231-35 (1956).
- GORDON, S.A. and R.P. WEBER: Colorimetric Estimation
Of Indoleacetic Acid.
Plant Physiol. 26, 192 (1951).

- GORDON, S.A.: The biogenesis of natural auxins.
In: The chemistry and mode of action
of plant growth substances, 65-76 (1956).
- GORDON, S.A. and L.G. PALEG: Observations on the quanti-
tative determinations of indoleacetic
acid.
Physiol. Plant. (Cpl.) 10, 39 (1957).
- GUNNING, B.E.S.: Auxin Activity in Ether-insoluble
Fractions of Extracts of Rhubarb Petioles.
Nature 192, 661-662 (1961).
- GUNNING, B.E.S.: Thesis of the University of Belfast,
Faculty of Science.
Studies on naturally-occurring plant
growth-substances (1962).
- HAGEN-SMIT, DANDLIKER, S.H. WITTWER and MURNEEK: Isolation
of 3-Indoleacetic Acid from Immature
Corn Kernels.
Am. Jour. of Bot. 33, 118 (1946).
- HAMILTON, R.H. and R.S. BANDURSKI: A Column Chromatogra-
phic Method for Isolation of IAA.
Plant Physiol. 33, Suppl. V (1958).
- HAMILTON, R.H., R.S. BANDURSKI and B. GRIGSBY: ISOLATION
OF INDOLE-3-ACETIC ACID FROM CORN KER-
nels AND ETIOLATED CORN SEEDLINGS.
Plant Physiol. 36, 354-357 (1961).
- HEMBERG, T.: Auxins and Growth-Inhibiting Substances in
Maize Kernels.
Physiol. Plant. 11, 284-311 (1958).
- HOUSLEY, S. and J.A. BENTLEY: IV. Chromatography of
hormones and hormones precursors in
cabbage.
J. exp. Bot. 7, 219 (1956).

- HOUSLEY, S., A. BOOTH and I.D.J. PHILLIPS: STIMULATION OF COLEOPTILE-AND ROOT-GROWTH BY EXTRACTS OF MAIZE.
Nature 178, 255-56 (1956).
- ISHI, H.: Some Properties of a Bound IAA in Pea Epicotyls.
Bot. Mag. Tokyo 77, 362-63 (1964).
- JEPSON, J.B.: Indolylacetamide: A chromatographic artifact from the natural indols, indolylacetylglucosiduronic acid and pyruvic acid.
Biochem. J. 69, 22 (1958).
- JERCHEL, D, und R. STAAB-MÜLLER: Analytische Kennzeichen und Wuchsstoffwirkung von Homologen und Peptiden der IES.
Z. Naturf. 9b, 411-415 (1954).
- KEFFORD, N.P.: The growth substances separated from plant extracts by chromatography.
J. exp. Bot. 6, 129 (1955).
- KLÄMBT, H.D.: Die 2-Hydroxy-Indol-3-essigsäure, ein pflanzliches Indolderivat.
Naturwiss. 46, 649 (1959).
- KLÄMBT, H.D.: Wachstumsinduktion und Wuchsstoffmetabolismus im Weizenkoleoptilzylinder. Reaktionsprodukte der IES in Abhängigkeit von der Inkubationskonzentration.
Planta 56, 309-321 (1961 a).
- KLÄMBT, H.D.: Wachstumsinduktion und Wuchsstoffmetabolismus im Weizenkoleoptilzylinder (II.).
Planta 56, 616-631 (1961 b).
- KLÄMBT, H.D.: Pyridoxalphosphat-abhängige oxydative Decarboxylierung von L-Tryptophan durch Meerrettich-Peroxydase.
Zeitschrift Naturf. 19b, 449 (1964).

- KURAISHI, S. and R.M. MUIR: Paper Chromatographic Study of Diffusible Auxin.
Plant Physiol. 39, 23-28 (1964).
- LABARCA, C., P.B. NICHOLLS and R.S. BANDURSKI: A Partial Charakterisation of Indolylacetoinositol from Zea mays.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 20, 641 (1965).
- LANE, F.E. and L.F. BAILEY: Isolation and Charakterization Studies on the S-Inhibitor in Dormant Buds of the Silver Maple, *Acer saccharinum* L.
Physiol. Plant. 17, 91 (1964).
- LARSEN, P.: Growth substances in higher plants.
In: K. Paech and M.V. Tracey (ed.): Modern Methods of Plant Analysis, III, 565 (1955).
- LARSEN, P.: On the separation of acidic and non-acidic auxins.
Physiol. Plant. 8, 343-357 (1955 b)
- LEOPOLD, A.C. and T.H. PLUMMER: Auxin-phenol complexes.
Plant Physiol. 36, 589-92 (1961).
- LIBBERT, E.: Die enzymatische Auxinbildung aus Tryptophan unter Einfluß eines nativen Inhibitors.
Planta 56, 1-22 (1961).
- LINSER, H. und O. KIERMAYER: Methoden zur Bestimmung pflanzlicher Wuchsstoffe.
Springer-Verlag Wien (1957).
- LINSKENS, H.F.: Papierchromatographie in der Botanik.
Springer-Verlag, Berlin-Göttingen - Heidelberg (1959).

- MAGIE, A.R., E.E. WILSON and T. KOSUGE: Indolacetamide as an intermediate in the synthesis of indoleacetic acid in *Pseudomonas savastoni*.
Science 141, 1281-82 (1963).
- MELCHIOR, G.H.: I. Über den Abbau von Indolderivaten. Photolyse durch ultraviolette Licht.
Planta 50, 265-290 (1957).
- MELCHIOR, G.H.: Über den Abbau von Indolderivaten. II. Abbau durch ein Enzymsystem aus Weißkohl und ein Vergleich der Indolderivate in UV-bestrahlten und unbestrahlten Weißkohlpflanzen.
Planta 50, 557-575 (1957).
- MEYER, J: Die photolytischen Abbauprodukte der IES und ihre physiologische Wirkung auf das Wachstum der Avenakoleoptile.
Zeitschrift Bot. 46, 125-160 (1958).
- MUIR, R.M.: Conversion of Tryptophan to auxin by plant tissue preparations.
Plant Physiol. 39, Suppl.XVII (1964).
- MÜLLER, F.: Über die natürlichen Indolverbindungen im Blumenkohl.
Planta 57, 463-477 (1961).
- NITSCH, J.P. and C. NITSCH: Studies on the growth of coleoptile and first internode sections. A new, sensitive straight-growth test for auxins.
Plant Physiol. 31, 94 (1956).
- OHWAKI, J.: Thin-layer chromatography of diffusible auxin of corn coleoptiles.
Bot. Mag. Tokyo 200, 79 (1966).

- van OVERBEEK, J.: A quantitative study of auxin and its precursor in coleoptiles.
Am. Jour. of Bot. 28, 1-10 (1941).
- PÁTAU, K.: Zur statistischen Beurteilung von Meßreihen.
Biolog. Zentrbl. 63, 152 (1943).
- PLATT, S.P. and K.V. THIMANN: Interference in Salkowski assay of IAA.
Science 123, 105-106, 1956.
- POOLE, R.J. and K.V. THIMANN: Uptake of Indole-3-acetic Acid and Indole-3-acetonitrile by Avena Coleoptile Sections.
Plant Physiol. 39, 98 (1964).
- PROCHÁZKA, A.: Phenole und aromatische Säuren.
In: Handbuch der Papierchromatographie (Herausgeber I.M. Hais und K. Macek), Fischer-Verlag Jena, Bd. 1, 311 (1958).
- RAADTS, E. und H. SÖDING: Chromatographische Untersuchungen über die Wuchsstoffe der Haferkoleoptile.
Planta 49, 47-60 (1957).
- REINERT, J.: Über den Wuchsstoffgehalt der Avenakoleoptile und die chemische Natur des extrahierbaren Auxins.
Z. Naturf. 5b, 374 (1950).
- REINERT, J. und E. FORSTMANN: Untersuchungen über das Auxin der Maiskoleoptile.
Planta 52, 623-628 (1959).
- REINERT, J.: Wachstum.
In: Fortschritte der Botanik 26, 243 (1963).
- REINEPT, J. und E. VOGEL: Untersuchungen über die Natur des extrahierbaren Auxins der Maiskoleoptile.
Planta 64, 281-286 (1965).

- RIDDLE, V.M. and M. MAZELIS: Conversion of Tryptophan to Indoleacetamide and further Conversion to Indoleacetic Acid by Plant Preparations.
Plant Physiol. 40, 482-84 (1965).
- ROUX, D.G.: Colour Reagents for the Paper Chromatography of Di- and Trihydroxy Phenols.
Nature 168, 1041 (1951).
- SCHIEWER, U. und E. LIBBERT: Indolacetamid - ein Intermediat der Indollessigsäurebildung aus Indolacetonitril bei der Alge *Furcellaria*.
Planta 66, 377-380 (1965).
- SCHNEIDER, G. und G. SPARMANN: Über ein Verfahren zur Durchführung der Papier-Hochspannungselektrophorese ohne Kühlung.
Naturwiss. 42, 156 (1955).
- SCOTT, T.K. and W.P. JACOBS: The isolation and identification of diffusible auxin.
Am. J. Botany 49, 657 (1962).
- SEELY, R.C., FAWCETT, C.H., R.L. WAIN and F. WIGHTMAN: Chromatographic investigations on the metabolism of certain indole derivatives in plant tissues.
In: The chemistry and mode of action of plant growth substances (1956).
- SEN, S.P. and A.C. LEOPOLD: Paper Chromatography of Plant Growth Regulators and Allied Compounds.
Physiol. Plant. 7, 98-108 (1954).
- SEN, S.P.: Wachstumsregulatoren und verwandte Stoffe.
In: Papierchromatographie in der Botanik, Linskens, H.F., 248 (1959).

- SHANTZ, E.M.: Chemistry of naturally-occurring growth
-regulating substances.
Annual Rev. of Plant Physiol. 17, 408
(1966).
- SHEN-MILLER and S.A. GORDON: III. Auxins relations in
illuminated shoots.
Plant Physiol. 37, 27-30 (1962).
- SHEN-MILLER, J. and S.A. GORDON: HORMONAL RELATIONS IN
THE PHOTOTROPIC RESPONSE. III. Move-
ment of ^{14}C -labeled and endogenous in-
doleacetic acid in phototropically sti-
mulated Zea coleoptiles.
Plant Physiol. 41, 59-65 (1966 a).
- SHEN-MILLER, J. and S.A. GORDON: HORMONAL RELATIONS IN
THE PHOTOTROPIC RESPONSE. IV. Light -
induced changes of endogenous auxins in
the coleoptile.
Plant Physiol. 41, 831 (1966 b).
- SHIBAOKA, H. and T. YAMAKI: A Sensitized Avena Curvature
Test and identification of the diffusible
auxin of Avena coleoptile.
Bot. Mag. Tokyo 72, 152-58 (1959).
- SIEGEL, S.M. and L. WEINTRAUB: Inactivation of IAA by
Peroxides.
Physiol. Plant. 5, 241 (1952).
- SRIVASTAVA, B.I.S. and M. SHAW: The physiology of host
-parasite relations. X. The metabolism
of indoleacetic acid- 1-C^{14} by wheat and
oat coleoptile sections, uninfected and
rusted leaves and uredospores of wheat
stem rust.
Can. J. Botany 40, 511-522 (1962).

- SRIVASTAVA, B.I.S.: Investigations on the Occurrence and Biosynthesis of Indolepyruvic Acid in Plant Tissues and Bacteria.
Plant Physiol. 39, 782 (1964).
- STEELINK, C.: Colour Reactions of Certain Phenols with Ehrlich's Reagent.
Nature 184, 720 (1959).
- STOWE, B.B. and K.V. THIMANN: The Paper Chromatography of Indole Compounds and some Indole-Containing Auxins of Plant Tissues.
Arch. Biochem. Biophys. 51, 499 (1954).
- STOWE, B.B., K.V. THIMANN and N.P. KEFFORD: Further Studies Of Some Indoles and Auxins By Paper Chromatography.
Plant Physiol. 31, 162-64 (1956).
- THURMANN, D.A. and H.E. STREET: Metabolism of Some Indole Auxins in Excised Tomato Roots.
J. of exp. Bot. 13, 369 (1962).
- TURIAN, G. and R.H. HAMILTON: Chemical detection of Indole-3-Acetic Acid in Ustilago Zeae tumors.
Biochem. Biophys. Acta 41, 148 (1960).
- VOGEL, E.: Untersuchungen über das Auxin in Alkohol-extrakten aus Maiskeleoptilen.
Diplomarbeit, Berlin 1964.
- WIGHTMANN, T.: Symposium on the Biochemistry and Physiology of auxin action.
Canad. J. of Bot. 40, 689-718 (1962).
- WINTER, A. and H.E. STREET: A new natural auxin isolated from "staled" root culture medium.
Nature 198, 1283-88 (1963).

ZENK, M.H.: 1-Indole-3-acetyl- β -D-Glucose, a New Compound in the Metabolism of IAA in Plants. Nature 191, 493-494 (1961).

ZENK, M.H. and G. MÜLLER: In vitro destruction of exogenously applied IAA as influenced by naturally occurring phenolic acids. Nature 200, 761-763 (1963).

ZENK, M.H.: Wachstum.

In: Fortschritte der Botanik 27, (1964).

BURKHOLDER, P.R. and E.S. JOHNSTON: Inactivation of plant growth substance by light. Smithson. Misc. Coll., 95 (1937).

Die Arbeit wurde in den Jahren 1964 bis 1966
im Pflanzenphysiologischen Institut der
Freien Universität durchgeführt. Für Thema-
stellung, Anregung und Kritik danke ich
Herrn Professor Dr. J. Reinert.

Lebenslauf

Am 13. Juni 1939 wurde ich als Sohn des Diplom - Forstwirtes Wolfgang Vogel und seiner Ehefrau Ina geb. Neiling in Aue geboren.

Von 1945 bis 1953 besuchte ich die Grundschule, danach bis zur Reifeprüfung im Jahre 1957 die Ernst-Schneller -Oberschule naturwissenschaftlichen Zweiges in Aue.

Kurz darauf übersiedelte ich nach Erlangen, wo ich im April 1958 am dortigen Gymnasium die Anerkennung meines Reifezeugnisses für die Bundesrepublik durch eine Sonderprüfung erwarb.

Im Sommersemester 1958 begann ich mit dem Studium der Biologie an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen, wechselte zum Sommersemester 1959 zur Ruprecht-Karl-Universität Heidelberg über, an der ich im Wintersemester 1960/61 das Vordiplom ablegte.

Seit dem Sommersemester 1961 studierte ich an der Freien Universität Berlin Botanik und bestand dort im Wintersemester 1963/64 das Diplomexamen in Biologie. Im Sommersemester 1962 war ich als studentische Hilfskraft am Institut für Genetik, danach erst als Hilfskraft, dann als Hilfsassistent am Pflanzenphysiologischen Institut tätig. Seit Sommersemester 1964 bin ich Doktorand und wiss. Assistent (m.d.W.b.) am Pflanzenphysiologischen Institut der Freien Universität.

Meine akademischen Lehrer waren vor allem die Herren Professor Dr. J.Reinert, Professor Dr. Th. Eckardt, Professor Dr. W.Rauh, Professor Dr. J.Schwemmle, Professor Dr. P.Sitte (Botanik); Professor Dr. H.J. Stammer, Professor Dr. Lüdicke, Professor Dr. W.Ulrich, Professor Dr. K.Urich, Professor Dr. K.Günther (Zoologie); Professor Dr. H.Lüers (allg. Biologie und Genetik); Professor Dr. Dr. G.Wittig, Professor Dr. Nast (Chemie); Professor Dr. N.Fleischmann und Professor Dr. Kopfermann (Physik).

